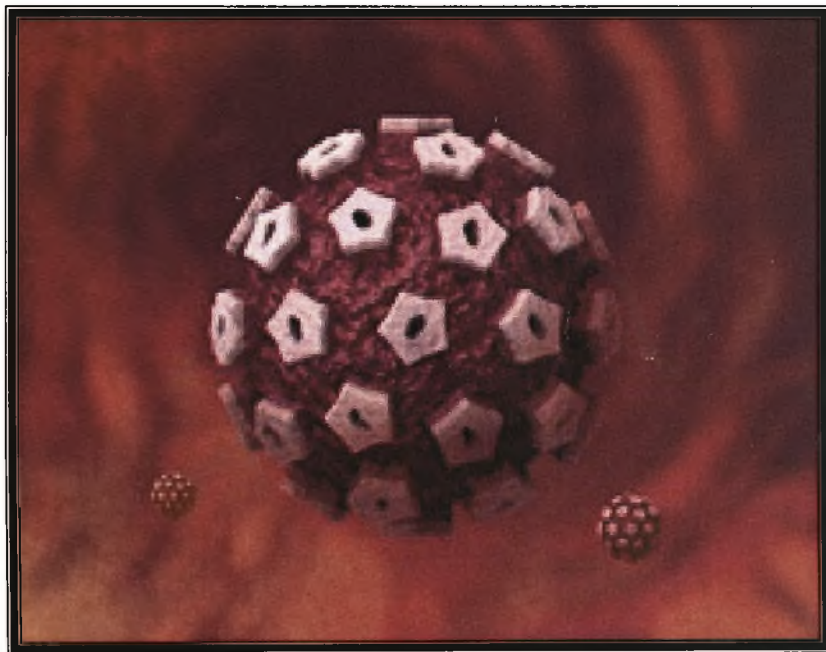


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Nested Multiplex PCR για τον γονοτυπικό προσδιορισμό των 14
πιο επικίνδυνων HPV ιών**



Επιβλέπων καθηγητής: Π. Μαρκουλάτος

ΤΣΑΚΟΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Λάρισα 2008



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.:	6170/1
Ημερ. Εισ.:	20-03-2009
Δωρεά:	Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός:	ΠΤ - ΒΒ
	2008
	ΤΣΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087332

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το εργαστηριακό – πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας με τίτλο « **Nested Multiplex PCR για τον γονοτυπικό προσδιορισμό των 14 πιο επικινδύνων HPV ιών** » πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας-Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Φεβρουάριος 2007 – Οκτώβριος 2007 υπό την συνεχή επίβλεψη του καθηγητή Π. Μαρκουλάτου.

Επιβλέπων καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Μέλη τριμελούς επιτροπής : Π. Μαρκουλάτος

Κ. Σταθόπουλος

Κ. Ματθιόπουλος

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας : 22-2-2008

Στους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Ιωάννα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή μου, κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την ανάθεση και την επίβλεψη της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του. Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις ιδιαίτερες συμβουλές και την υπομονή που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια του πειραματικού και συγγραφικού μέρους της παρούσας εργασίας. Ακόμη θέλω να τον ευχαριστήσω εκ βαθέων για την όλη εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα και κυρίως για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, δίνοντας μου την ευκαιρία να γνωρίσω τον κόσμο της ιολογίας, καθώς επίσης ώθηση και όρεξη να συνεχίσω να εργάζομαι πάνω στον τομέα αυτό.

Επίσης θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες για τους υποψήφιους διδάκτορες Δεδεψίδη Ευάγγελο, Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και Πλιάκα Βάια για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα που αναπτύξαμε στο εργαστήριο και για την στενή συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Η συμβολή τους συντέλεσε σημαντικά στην ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της εργασίας, βοηθώντας στο να ξεπεραστούν οποιαδήποτε εργαστηριακά προβλήματα. Τέλος ευχαριστώ τον φίλο και συνάδερφο Γκορτσίλα Πασχάλη με τον οποίο πραγματοποιήσαμε μαζί το σημαντικότερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας και ιδιαίτερα τον ευχαριστώ για την φιλική και αρμονική συνεργασία καθώς επίσης και για την αμέριστη συμπαράσταση του.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
1. Η Βιολογία των Human Papilloma viruses (HPV).....	9
1.1.Γενικά χαρακτηριστικά.....	9
1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses	10
1.2.1 Alpha-papillomavirus.....	12
1.2.2 Beta-papillomavirus	12
1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus.....	13
2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)	14
2.1 Δομή καψιδίου	14
2.2 Οργάνωση του γενώματος	16
2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1	17
2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2	18
2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4	19
2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5	20
2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6	20
2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7	22
3. Ο κύκλος ζωής των HPV	24
3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο.....	24
3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος.....	25
3.3 Διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.....	26
3.4 Μεταγραφή του ιικού γενώματος	27
3.5 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού	28
3.6 Ιστολογικές αλλοιώσεις.	29
4. Κλινικές Εκδηλώσεις	30
4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.	31
5. Εργαστηριακή διάγνωση.	33
5.1 Pap test.....	33
5.2 Hybrid Capture II test	33
5.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR.....	34
5.3.1 PCR με εκκινητικά μόρια MY09/MY11 και GP5+/GP6+.....	34
5.3.2. PCR σε συνδυασμό με Microarrays.....	34
5.3.3 Real time PCR.....	35

5.3.4. Nested Multiplex PCR.	35
6. Υλικά και μέθοδοι.....	37
6.1 Κλινικά δείγματα.	37
6.2 Προετοιμασία DNA.	37
6.3 Εκκινητικά μόρια PCR	38
6.4 Τύπο-ειδικοί εκκινητές για Nested Multiplex PCR.	38
6.5 Πλασμίδια	40
6.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β- γλοβουλίνης.....	40
6.7 PCR με εκκινητικά μόρια: GPE6- 3F, GPE6-5B και GPE6-6B.....	41
6.8 Nested Multiplex PCR με τρία μείγματα εκκινητών.	42
7. Αποτελέσματα	44
7.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης.	44
7.2 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το πρώτο μείγμα εκκινητικών μορίων.	45
7.3 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το δεύτερο μείγμα εκκινητικών μορίων. ...	47
7.4 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το τρίτο μείγμα εκκινητικών μορίων.	49
8. Συζήτηση	54
9. Βιβλιογραφία.....	58

Περίληψη

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα από τον Francis Peyton Rous και ανήκουν στην οικογένεια των papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί επιθήλιο-πολλαπλασιαζόμενοι ιοί και ευθύνονται για την πρόκληση θηλωμάτων, που μπορούν να εξελιχθούν σε κακοήγη όγκο. Μολύνουν μια ευρεία κλίμακα οργανισμών, η οποία εκτείνεται από τα πτηνά μέχρι τα θαλάσσια θηλαστικά. Ο ιός των θηλωμάτων απέκτησε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον όταν διαπιστώθηκε ότι προκαλεί μια σειρά δερματικών αλλοιώσεων στον άνθρωπο.

Ο Ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV) μεταδίδεται μέσω δερματικής επαφής και είναι υπεύθυνος για την πρόκληση ποικίλων ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Οι περισσότερες HPV λοιμώξεις είναι ασυμπτωτικές. Έχουν πλήρως αναγνωριστεί περισσότεροι από 130 τύποι του ιού, ορισμένοι από τους οποίους ευθύνονται για την πρόκληση δερματικών κονδυλωμάτων, κυρίως των παλαμών και των πελμάτων. Το ένα τρίτο των τύπων του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και αναπτύσσεται στη γεννητική περιοχή των ατόμων. Επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει σαφώς ότι διάφοροι τύποι των HPV (HPV-υψηλού κινδύνου) αποτελούν βασική αιτία πρόκλησης καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας, ενώ ορισμένοι άλλοι τύποι HPV (HPV- χαμηλού κινδύνου) προκαλούν κοινά κονδυλώματα του γενετικού συστήματος. Παρά το γεγονός ότι η εφαρμογή των προληπτικών κυτταρολογικών εξετάσεων (test pap) ελάττωσε την εμφάνιση της νόσου στις Δυτικές χώρες, τα ποσοστά παραμένουν αρκετά υψηλά.

Για τον λόγο αυτό η ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV έχει μεγάλη ερευνητική σημασία για την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της μόλυνσης. Η ετερογένεια του φάσματος των HPV και η σημαντική επίπτωση των πολλαπλών μολύνσεων στην ανάπτυξη καρκίνου κάνει απαραίτητη την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων για την αναγνώριση των ποικίλων HPV γονοτύπων, όχι μόνο για επιδημιολογικές μελέτες αλλά και για την θεραπεία των ασθενών. Για τον σκοπό αυτό εργαστήρια παγκοσμίως ασχολούνται με την ανάπτυξη νέων μεθόδων ή για την βελτίωση των ήδη υπαρχόντων, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του ιού πριν ακόμα εκδηλωθούν τα κλινικά συμπτώματα (κονδυλώματα-καρκίνος). Μια σημαντική μέθοδος με εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία για την άμεση ανίχνευση και ταυτοποίηση του ιού είναι η Nested Multiplex PCR, με την οποία ασχολείται η συγκεκριμένη αυτή εργασία.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εφαρμογή της Nested Multiplex PCR για τον γονοτυπικό προσδιορισμό των 14 πιο επικίνδυνων HPV (High risk) (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58, 59, 66, 68).

Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν και εξετάστηκαν συνολικά 71 κλινικά δείγματα από το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αθηνών Άγιος Σάββας. Για την επίτευξη της μεθόδου αυτής χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πρώτο επίπεδο οι GP- E6/E7 εκινητές (degenerate primers), με τους οποίους ενισχύθηκε με μια πρώτη PCR το ιικό DNA στην περιοχή των γονιδίων E6 και E7 όλων των HPV γονοτύπων υψηλής επικινδυνότητας. Στην συνέχεια με την χρήση τύπο-ειδικών Nested PCR εκινητών, πραγματοποιήθηκε Nested Multiplex PCR για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των 14 HPV ιών που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία.

1. Η Βιολογία των Human Papilloma viruses (HPV)

1.1.Γενικά χαρακτηριστικά

Οι Papilloma ιοί (από την λατινική λέξη papilla: θηλή ή φλύκταινα και την ελληνική κατάληξη oma: όγκος) συγκροτούν την μεγάλη οικογένεια των Papillomaviridae. Είναι δίκλωνοι κυκλικοί DNA ιοί μεγέθους 7900 bp χωρίς εξωτερικό περίβλημα. Προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου και σχετίζονται με την ανάπτυξη ενδοεπιθηλιακών αλλοιώσεων. Είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη μιας σειράς βλαβών, οι οποίες εκτείνονται από κοινά θηλώματα μέχρι καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και καρκίνο του πέους (Zur Hausen 1996).

Ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, όταν αποδείχθηκε ότι τα δερματικά θηλώματα μπορούσαν να μεταδοθούν μεταξύ ατόμων με την βοήθεια ενός διηθητού παράγοντα. Το 1935 ο Francis Peyton Rous, ο οποίος πρόσφατα είχε αποδείξει την πρόκληση σαρκώματος στα κοτόπουλα από ιό, συσχέτισε τους papilloma ιούς με τον καρκίνο του δέρματος. Παρατήρησε ότι μολυσμένα κουνέλια του γένους *sylvilagus* εμφάνιζαν θηλώματα, τα οποία μετά από σύντομο χρονικό διάστημα μετατρέπονταν σε κακοήγη όγκο. Αυτή ήταν η πρώτη απόδειξη που ενοχοποιούσε τους ιούς για την πρόκληση καρκίνου. Από τότε διάφοροι τύποι της ομάδας αυτής των ιών εντοπίστηκαν και συνδέθηκαν με την δημιουργία όγκων σε πολλά είδη μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος. Οι ιοί των θηλωμάτων έγιναν ευρέως γνωστοί στις αρχές της δεκαετίας του 80 καθώς ανακαλύφθηκε, ότι ορισμένα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV – Human Papilloma Viruses) συσχετίζονται με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, μία από τις πλέον διαδεδομένες μορφές καρκίνου παγκοσμίως. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως (Parkin et al 2000)

Οι ιοί των ανθρώπινων θηλωμάτων μεταδίδονται μέσω δερματικής επαφής. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί και έχουν πλήρως αλληλουχηθεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι HPV, ενώ περισσότεροι από 120 θεωρητικά καινούργιοι τύποι έχουν εν μέρει χαρακτηριστεί (Zur Hausen 2000). Μια ομάδα 30 στελεχών του ιού μεταδίδεται μέσω σεξουαλικής επαφής και προσβάλλει το ουρογεννητικό σύστημα. (Gillison 2001). Οι HPV βάση του τροπισμού τους μπορούν να διαχωριστούν σε δερματικούς και στους ιούς εκείνους

που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου. Οι τελευταίοι ανάλογα με την έκταση και την σοβαρότητα της βλάβης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες (πίνακας 1). Στην ομάδα υψηλής επικινδυνότητας (High risk), τα μέλη της οποίας είναι συνδεδεμένα με την πρόκληση ‘επεκτατικού’ καρκίνου συνήθως του ουρογενετικού συστήματος. Στην ομάδα ενδιάμεσης επικινδυνότητας (Middle risk), τα μέλη της οποίας μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες. Τέλος στην ομάδα χαμηλής επικινδυνότητας (Low risk) τα μέλη της οποίας εντοπίζονται σπανίως σε καρκίνο άλλα είναι στενά συνδεδεμένα με την πρόκληση θηλωμάτων (Munoz N. et al 2003) .

Ομάδα επικινδυνότητας	Τύπος HPV
Υψηλού κινδύνου (High risk)	HPV-,16,18 ,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68,73,82,83
Ενδιάμεσου κινδύνου (middle risk)	HPV-26,53,66
Χαμηλού κινδύνου (Low risk)	HPV-6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81

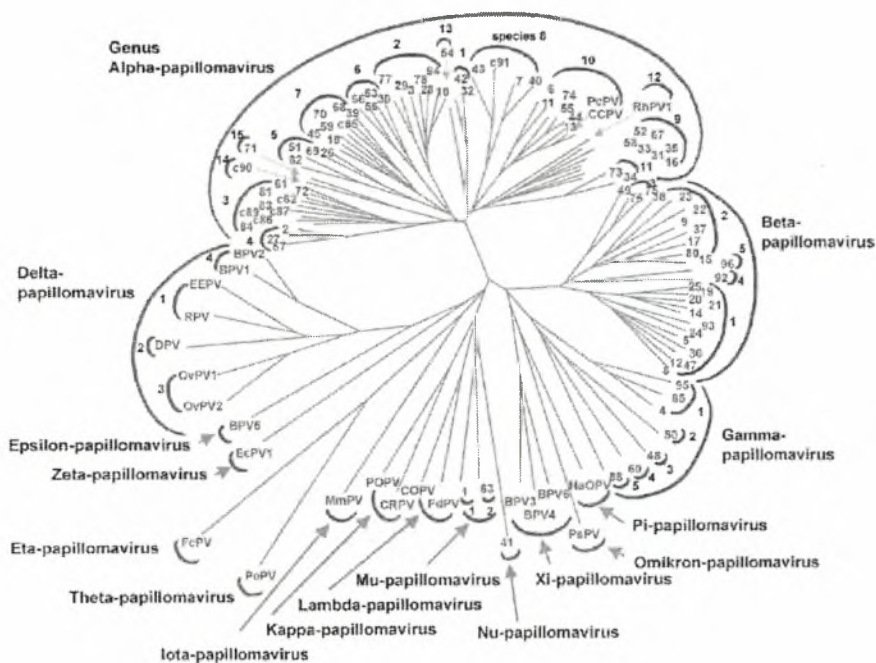
Πίνακας 1.1. Αναφορά στις ομάδες επικινδυνότητας των αντίστοιχων HPV τύπων.

Εκτός από τον καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας ο HPV επίσης σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πέους, της μήτρας και του πρωκτού. Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι καρκίνος του λάρυγγα, του οισοφάγου και του πνεύμονα ιστολογικά μοιάζει με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας γεγονός που εμπλέκει τους pīpilloma ιούς στους προαναφερθέντες τύπους καρκίνου

1.2 Ταξινόμηση των papillomaviruses

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) αρχικά ομαδοποιήθηκαν μαζί με τους polyomaviruses και τον SV40 στην μεγάλη οικογένεια των Paponaviridae. Η ομαδοποίηση αυτή βασίστηκε στην ομοιότητα του καψιδίου των παραπάνω ιών, στην έλλειψη περιβλήματος καθώς επίσης στην ύπαρξη δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA (Danos O et al 1989). Πρόσφατα όμως από την διεθνή επιτροπή ταξινόμησης των ιών (ICTV) έγινε αποδεκτό ότι οι ιοί των θηλωμάτων-papillomaviruses αποτελούν μια ξεχωριστή ταξινομική οικογένεια ιών των Papillomaviridae, η οποία δεν σχετίζεται καθόλου με τους polyomavirus και τον SV40. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε βάση της διαφοράς της οργάνωσης, του μεγέθους και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των papillomaviruses και των μελών της οικογένειας Paponaviridae (de villiers E.M et al 2004).

Οι papilloma ιοί δεν κατηγοριοποιούνται σε ορότυπους. Η ταξινόμηση των ιικών τύπων γίνεται, βάση της προέλευσης του στελέχους και του βαθμού συγγένειας των ιικών γενωμάτων (Shih-Yen Chan et al 1995). Οι papilloma ιοί ομαδοποιούνται σε διαφορετικά γένη, τα ονόματα των οποίων προέρχονται από ένα γράμμα της ελληνικής αλφάβητου. Έτσι έχουμε τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu- papillomavirus. Κάθε γένος διαχωρίζεται περαιτέρω σε τύπους, υπότυπους και διάφορες παραλλαγές (variants), βάση της ομοιότητας της αλληλουχίας του καψιδιακού γονιδίου L1. Η αλληλουχία του γονιδίου L1 διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τύπων τουλάχιστον 10% ενώ μεταξύ υπότυπων και variants 2% - 10% και 2% αντίστοιχα (de villiers E.M et al 2004). Τα γένη Alpha, Beta, Gamma, Mu και Nu περιέχουν στελέχη των papilloma ιών που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο, ενώ τα υπόλοιπα γένη (Pi, Xi, Lamda, κ.α) όπως παρουσιάζεται και στη εικόνα 2 περιέχουν στελέχη papilloma ιών που έχουν εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία πτηνών και άλλων θηλαστικών (Charles E. et al 2007, A.Antonson et al 2006)



Εικόνα 2: Φυλογενετικό δέντρο 118 papilloma ιών που βασίζεται στην αλληλουχία του καψιδιακού γονιδίου L1. Στο δέντρο αυτό παρουσιάζονται όλα τα γένη και οι αντιπροσωπευτικοί τύποι των papilloma ιών (de Villiers E.M. et al 2004)

1.2.1 Alpha-papillomavirus

Το γένος των Alpha-papillomaviruses είναι το μεγαλύτερο γένος από τα υπόλοιπα και περιλαμβάνει τους papilloma ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του βλεννογόνου.. Το γένος των Alpha-papillomaviruses επίσης συμπεριλαμβάνει και τους ιούς εκείνους που προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος όπως ο HPV-2, ο οποίος προκαλεί κοινά θηλώματα και σπάνια εμπλέκεται στην πρόκληση καρκίνου. Περισσότεροι από 30 διαφορετικοί τύποι είναι γνωστό ότι επιδρούν στο επιθήλιο του τραχήλου και μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Αυτοί οι τύποι HPV όπως έχει αναφερθεί ταξινομούνται ως υψηλής επικινδυνότητας (High risk). Ο HPV -16 και ο HPV-18 είναι οι κύριοι παράγοντες για την πρόκληση τραχηλικών αλλοιώσεων, που μπορούν να εξελιχθούν σε καρκίνο του τραχήλου. Έχει παρατηρηθεί ότι στο 90% των περιπτώσεων του καρκίνου του τραχήλου ανευρίσκεται DNA από HPV και περίπου σε ποσοστό της τάξης του 50% αυτών των περιπτώσεων ανευρίσκεται το DNA του HPV-16 (Bosch et al 2001). Οι υπόλοιποι τύποι αυτού του γένους των ιών ταξινομούνται, ως ενδιάμεσου κινδύνου (Mediate risk) και χαμηλού κινδύνου (Low risk), βάση της συχνότητας με την οποία εντοπίζονται σε καρκινικές αλλοιώσεις. Οι ιοί χαμηλού κινδύνου εμπλέκονται στην πρόκληση καρκίνου πολύ σπάνια, άλλα ερευνητικά και διαγνωστικά παρουσιάζουν ενδιαφέρον καθώς προκαλούν θηλώματα του ουρογεννητικού συστήματος. (Doorbar. J 2006).

1.2.2 Beta-papillomavirus

Οι τύποι HPV που προσβάλλουν το δέρμα διαχωρίζονται σε τέσσερα διαφορετικά γένη (Beta, Gamma, Mu και Nu-papillomaviruses). Οι ιοί αυτοί συχνά εντοπίζονται σε δείγματα υγιούς δέρματος, αποδεικνύοντας ότι προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις.

Το γένος των Beta papillomaviruses διαιρείται σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη. Τα μέλη της οικογένειας αυτής προσβάλλουν το επιθήλιο του δέρματος χωρίς να προκαλούν αλλοιώσεις. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί, ότι η μόλυνση από τα στελέχη του συγκεκριμένου γένους σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική ασθένεια EV (epidermodysplasia verruciformis), μπορούν να προκαλέσουν μη μελανωματικό καρκίνο του δέρματος (Pfister 2003). Κυρίως τα στελέχη HPV-5 και HPV-8 παρουσιάζονται στο 90% αυτών των όγκων (Kremsdorf D. et al 1983).

1.2.3 Gamma, Mu, Nu Papillomavirus

Τα υπόλοιπα στελέχη HPV προέρχονται από τρία άλλα γένη (Gamma, Mu and Nu) και προκαλούν δερματικά θηλώματα, τα οποία δεν εξελίσσονται ποτέ σε καρκίνο. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2.1) περιγράφονται συνοπτικά τα στελέχη των γενών Beta, Gamma, Mu, Nu paillomavirus (Doorbar. J 2006)

Γένος	Στέλεχος
Beta papillomavirus	HPV- 2, 5, 8, 107
Gamma Papillomavirus	HPV- 101, 103
Mu Papillomavirus	HPV- 1, 63
Nu Papillomavirus	HPV- 41

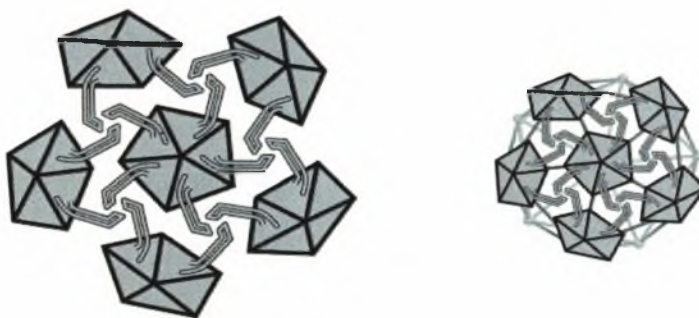
Πίνακας 1.3: Σύντομη αναφορά στα γένη και τα στελέχη των HPV.

2. Δομή του Human papillomavirus (HPV)

2.1 Δομή καψιδίου

Οι papilloma ιοί είναι μια ομάδα μικρών δίκλωνων DNA ιών μεγέθους 7900 bp. Δεν περιλαμβάνουν εξωτερικό περίβλημα και έχουν διάμετρο της τάξης των 50-60 nm (Zhi-Ming Zheng et al. 2006). Τα ιικά σωματίδια στην εξωτερική του επιφάνεια αποτελείται από 72 πενταμερή της καψιδιακής πρωτεΐνης L1, σχηματίζοντας εικοσαεδρικά καψίδια με triangulation number $T=7$ (Baker et al 1991). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 είναι ο παράγοντας, ο οποίος συμβάλει στην αναγνώριση των ιικών σωματίων από το ανοσολογικό σύστημα του προσβεβλημένου ατόμου (Yang R et al 2004). Η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 τοποθετείται εσωτερικά του σκελετού της L1 και έχει άγνωστο δομικό ρόλο. Πιστεύεται ότι η πρωτεΐνη L2 συνδέεται μέσω μιας υδροφοβικής περιοχής κοντά στο C-τελικό άκρο της, με την L1 πρωτεΐνη. Μέσω αυτής της περιοχής η L2 εισέρχεται στο κέντρο του πενταμερούς L1 (Finnen R.L et al 2003). Βασική της λειτουργία είναι η συμβολή της μαζί με την ιική πρωτεΐνη E2 στο πακετάρισμα του ιικού DNA στα νεοσχηματιζόμενα ιικά καψίδια (Buck C.B et al 2004). Οι κυτταρικές ιστόνες συμπυκνώνουν το γένωμα του ιού σε ένα δίκλωνο κυκλικό DNA "μίνι-χρωμόσωμα" εντός του καψιδίου L1/L2. (Howley 1996).

Η κατασκευή του $T=7$ papilloma ιικού σωματιδίου δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Παρόλα αυτά, έχει διαπιστωθεί ότι η κρυσταλλική δομή της μικρότερης δομικής μονάδας, $T=1$ περιέχει δώδεκα L1 πενταμερή (Modis Y. et al 2002).

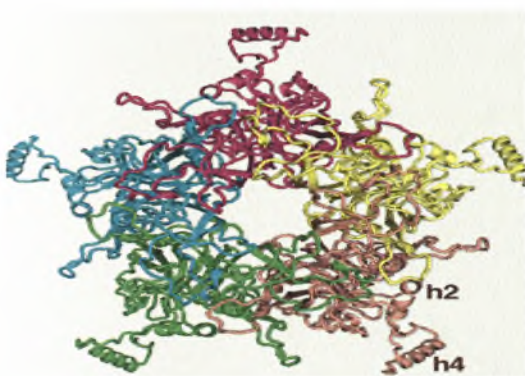


Εικόνα 2 : $T=1$, HPV-16 (Y. Modis et al 2002)

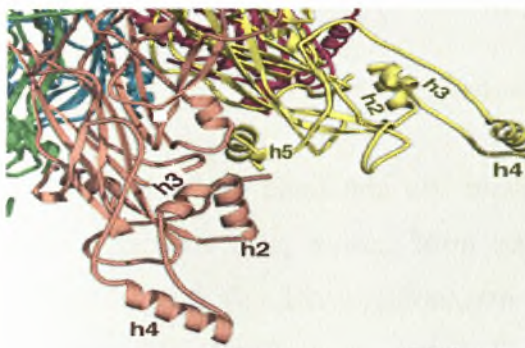
Η υψηλή ανάλυση της κρυσταλλικής δομής της $T=1$ δομής αποκαλύπτει την L1 πενταμερή διαμόρφωση καθώς επίσης και την αλληλεπίδραση μεταξύ των πενταμερών, που αποτελεί βασική αρχή για την δημιουργία της $T=1$ δομής. Το L1 πενταμερές περιέχει πέντε θηλιές που μοιάζουν με πλαϊνές προεξοχές, οι οποίες αποτελούνται από 100 C-τελικά άκρα. (εικόνα

2.1). Κάθε προεξέχουσα θηλιά αποτελείται από μια α -έλικα, η οποία είναι 'αγκιστρωμένη' στον δομικό πυρήνα του L1 πενταμερούς δια μέσου δύο ελίκων, την έλικα 2 και την έλικα 3, (εικόνα 2.2).

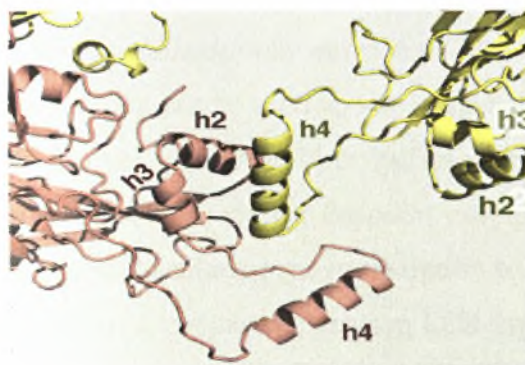
Τα πενταμερή είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με ισχυρούς υδρόφοβους δεσμούς μεταξύ της έλικας 4 του ενός πενταμερούς με την έλικα 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. Τα υπόλοιπα C-τελικά άκρα επιστρέφουν στον πυρήνα της L1 για να σχηματίσουν την έλικα 5 (εικόνα 2.3) (Brooke Bishop et al 2007).



Εικόνα 2.1. Όψη ενός L1 πενταμερούς. Απεικονίζο πλευρικές προεξοχές από κάθε ένα από τα πέντε μονομέρη (κάθε ένα με διαφορετικό χρώμα) (Brooke Bishop et al 2007).



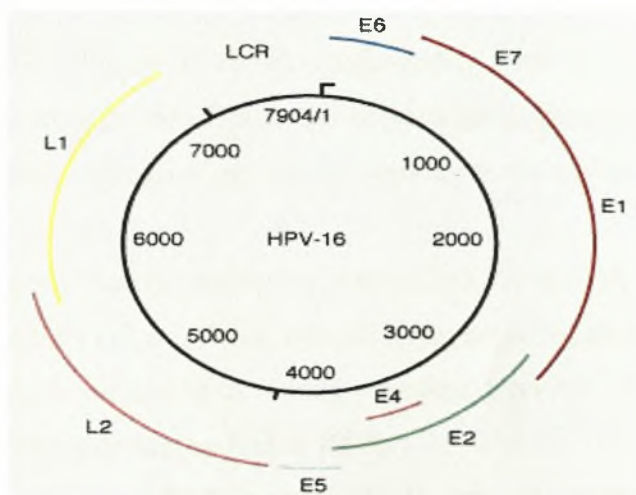
Εικόνα 2.2: Πιο κοντινή όψη των πλευρικών προεξοχών δύο μονομερών δείχνοντας την ακριβή θέση των ελίκων- 2, 3, 4, 5, και του C-τελικού άκρου της L1 (Brooke Bishop et al 2007).



Εικόνα 2.3: Η δια-πενταμερής έλικα-έλικα αλληλεπράξη μεταξύ δύο πενταμερών στο T=1. Η έλικα 4 του πενταμερούς (κίτρινο) αλληλεπιδρά με την έλικα 2 και 3 του γειτονικού πενταμερούς. (Brooke Bishop et al 2007).

2.2 Οργάνωση του γενόματος

Το γονιδίωμα των Papilloma ιών όπως έχει αναφερθεί είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μεγέθους 7.904 βάσεων. Στα ιικά σωματίδια το DNA βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες σχηματίζοντας μια μορφή που μοιάζει με χρωματίνη (Howley P.M 1996). Το γονιδίωμα των papilloma ιών, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.4 περιλαμβάνει 6 μη δομικά ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 και δύο δομικά γονίδια L1, L2 (Zhi-Ming Zheng et al 2006).



εικόνα 2.4: Παρουσίαση του γενόματος του HPV-16

Το γένωμα των papilloma ιών περιέχει οχτώ ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF's) και διαχωρίζεται σε τρεις τομείς, βάση των λειτουργικών δραστηριοτήτων. Έτσι έχουμε την πρώιμη περιοχή (E= Early region), την όψιμη περιοχή (L=late region) και την ρυθμιστική περιοχή LCR. Η πρώιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις πρώιμες ιικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες E1, E2, E4, E5, E6 και E7 που επηρεάζουν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του DNA των μολυσμένων κυττάρων (Danos O et al 1982). Η όψιμη περιοχή κωδικοποιεί για τις όψιμες δομικές πρωτεΐνες, που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο τις L1 και L2. Η έκφραση του γενόματος του HPV-16 ρυθμίζεται από δύο βασικούς υποκινητές. Τον p97 υποκινητή που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (Smotkin et al 1986) και τον p670 που είναι υπεύθυνος για την έκφραση των όψιμων γονιδίων (Grassmann K et al 1996).

Τέλος η ρυθμιστική περιοχή LCR έχει μέγεθος 850 bp και δεν περιέχει στην αλληλουχία της ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται μεταξύ του τέλους του γονιδίου L1 και στην αρχή του γονιδίου E6. Ακόμη η LCR περιέχει την θέση έναρξης της

αντιγραφής και πολλές ρυθμιστικές αλληλουχίες για την έκφραση του ιικού DNA (Demeret et al 1995, Shyh-Han Tan et al 2002).

2.2.1 Η ιική πρωτεΐνη E1

Η πρωτεΐνη E1 είναι μια πολυλειτουργική πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη με χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Έχει μέγεθος περίπου 70-80 KDa και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιικού γενώματος. (Ustav and Stenlund, 1991). Παρουσιάζει μια εκτεταμένη αμινοξική και λειτουργική ομολογία με το μεγάλο T-αντιγόνο του SV-40 και του polyoma ιού (Masky et al 1997, Clertant P 1984). Η πρωτεΐνη αυτή έχει την δυνατότητα να προσδένεται σε ειδικές περιοχές του DNA, έχει δραστικότητα ελικάσης, ATPάσης και την δυνατότητα να σχηματίζει σύμπλοκα με την E2 πρωτεΐνη και την μεγάλη υπομονάδα της DNA πολυμεράσης α.

Η δραστικότητα της ATPάσης τοποθετείται στην C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης. Το C-τελικό άκρο της E1 του HPV-11 συμβάλλει στον ολιγομερισμό της σε ένα εξαμερές (Thorner LK et al. 1993). Αυτός ο τομέας είναι επίσης υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση με την πολυμεράση α του ξενιστή (Masterson J. et al 1998).

Παρουσία ATP η E1 προσδένεται στην LCR σε μία περιοχή πλούσια σε AT προκαλώντας δομικές αλλαγές (Shawn E. Holt and Van G. Wilson 1995). Σαν πρωτεΐνη έναρξης της αντιγραφής η E1 έχει δύο βασικούς ρόλους. Πρώτον δρα σαν πρωτεΐνη πρόσδεσης, αναγνωρίζοντας την θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και δεύτερον δρα σαν ελικάση με αποτέλεσμα να ξεδιπλώνει την θέση έναρξης της αντιγραφής και να προχωρά η αντιγραφική διχάλα (Liu J.S. et al 1995).

Η E1 προσδένεται σε μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 18 bp εντός της περιοχής έναρξης της αντιγραφής με την βοήθεια της πρωτεΐνης E2, η οποία λειτουργεί ως διμερής αντιγραφικός παράγοντας (Titolo S. et al 2003). Το σύμπλοκο E1-E2 αποτελείται από ένα E2 διμερές και δύο μόρια E1. Το σύμπλοκο αυτό δρα σαν δομική μονάδα για την συγκρότηση ενός μεγαλύτερου E1 εξαμερούς συμπλόκου, που έχει την ιδιότητα να ξετυλίγει το DNA (Sedman J et al 1998). Η E2 επομένως λειτουργεί σαν παράγοντας που κατευθύνει την E1 στην περιοχή πρόσδεσής της και επιπρόσθετα σαν παράγοντας που συναρμολογεί τα E1 μονομερή (Liu J.S et al 1995).

Η E1 είναι ένας ελκυστικός στόχος για την ανάπτυξη αντί-HPV φαρμάκων, καθώς η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και παθογένεια (Peter W. White et al.2005)

2.2.2 Η ιική πρωτεΐνη E2

Η E2 πρωτεΐνη είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDA, δρα σαν διμερές και ρυθμίζει την αντιγραφή και την μεταγραφή του ιικού DNA (Laimins et al 1998). Αποτελείται από τρεις περιοχές: C-τελική περιοχή, η οποία κωδικοποιεί και σχηματίζει μια διμερή δομή β-βαρελίου που προσδένεται στο DNA (Hegde et al 1992). Μια περιοχή- αρμός (hinge region), και την N-τελική περιοχή, η οποία σχηματίζει μια α-έλικα (Anston et al 2000). Η N-τελική και η C-τελική περιοχή είναι πολύ καλά συντηρημένες μεταξύ των HPV, ενώ η hinge περιοχή δείχνει μεγαλύτερη ετερογένεια (Francis et al 2000).

Η E2 πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι μια πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται σε ειδικές θέσεις πάνω στο DNA βοηθώντας την πρόσδεση της E1 στην θέση έναρξης της αντιγραφής. Επίσης επιδρά στην ρύθμιση μεταγραφής δρώντας ως ενεργοποιητής ή καταστολέας (Cripe et al 1987). Η E2 προσδένεται σε τέσσερις θέσεις της συντηρημένης αλληλουχίας ACCGN₄CGGT (Bouvard V. et al. 1994). Οι περιοχές αυτές είναι εντός της περιοχής LCR του HPV-16 και ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων E6 και E7 (Smotkin et al 1986). Δύο από αυτές τις περιοχές βρίσκονται στο TATA Box ακριβώς ανοδικά του υποκινητή p97 του γονιδίου E6 και συνορεύουν στο 5' άκρο με μια θέση πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 και στο 3' άκρο με τον παράγοντα πρόσδεσης στο TATA box (TBP). Η πρόσδεση της E2 σε αυτές τις περιοχές κοντά στον υποκινητή εμποδίζει την πρόσδεση του Sp1 και του TBP στις αντίστοιχες θέσεις τους και επάγει την καταστολή της μεταγραφής (Dostatni et al 1991, Tan et al 1992). Οι άλλες δύο θέσεις εντοπίζονται πιο ανοδικά του υποκινητή. Η πρόσδεση της E2 στις περιοχές αυτές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (Ham et al 1994).

Η E2 παρουσιάζει διαφορετική συγγένεια για τις θέσεις πρόσδεσης και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E2 για τον αν θα καλυφθούν όλες οι θέσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η E2 συνδέεται στις θέσεις τοποθετημένες μακριά από τον υποκινητή του γονιδίου E6. Στην περίπτωση αυτή οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδεθούν και να ξεκινήσει η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 (Steger and Corbach, 1997). Όταν η συγκέντρωση της E2 είναι υψηλή και οι τέσσερις θέσεις πρόσδεσης της E2 είναι κατειλημμένες και οι κυτταρικοί μεταγραφικοί παράγοντες όπως ο Sp1 και TFIID/B

εκτοπίζονται από το TATA box. Σε αυτή την περίπτωση η E2 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας και σταματά η έκφραση των E6 και E7. (Romanczuk et al 1990, Steger and Corbach 1997). Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι όταν το ιικό DNA είναι σε επισωμική μορφή σταματά η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων E6 και E7 από την E2 (Bechtold et al 2003).

2.2.3 Η ιική πρωτεΐνη E4

Η πρωτεΐνη E4 συντίθενται στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής του HPV και εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα από όλες τις πρωτεΐνες του ιού. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης της E4 μεταφράζεται μαζί με τα πέντε πρώτα αμινοξέα του E1 γονιδίου σχηματίζοντας την E1⁺E4 πρωτεΐνη, καθώς απουσιάζει από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του E4 το κωδικόνιο λήξης AUG (Howley P.M 1996). Όλοι οι papilloma ιοί εκφράζουν την πρωτεΐνη E1⁺E4 στην όψιμη φάση του κύκλου ζωής τους.

Η E1⁺E4 είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της αντιγραφής του ιικού γενώματος στην όψιμη φάση της ζωής του ιού (Wilson R et al 2005) ενώ άλλες μελέτες εμπλέκουν την E1⁺E2 ως ρυθμιστή της όψιμης και της πρώιμης φάσης της ζωής των HPV. Παρόλα αυτά όμως η λειτουργία της E1⁺E4 μπορεί να μην είναι απαραίτητη για την αντιγραφή όλων των τύπων των papilloma ιών (Fang L et al 2006).

Η πρωτεΐνη E1⁺E4 του HPV-16 μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις λειτουργικές περιοχές: Το N-τελικό άκρο με το πλούσιο σε λευκίνη μοτίβο (LLXLL), την κεντρική περιοχή πλούσια σε προλίνη και την C-τελική περιοχή (Roberts et al 1994). Έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη E1⁺E4 αλληλεπιδρά με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα επάγοντας την καταστροφή του δικτύου και την απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα το συντηρημένο μοτίβο πλούσιο σε λευκίνη (LLXLL) στο N-τελικό άκρο της E1⁺E4 είναι απαραίτητο για την αλληλεπίδραση με το δίκτυο ινιδίων κερατίνης ενώ το C-τελικό άκρο της E1⁺E4 των HPV-16 και HPV-18 απαιτείται για την καταστροφή του (Roberts et al 1994).

Μια ακόμη λειτουργία της E1⁺E4 των HPV-11 και HPV-16 είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2 (G2 arrest) σε μία ποικιλία κυτταρικών σειρών (Davy C.E et al 2002).

Τέλος η E1⁺E4 πρωτεΐνη του HPV-16 έχει την δυνατότητα να επάγει την απόπτωση καθώς έχει μελετηθεί η σύνδεση και αλληλεπίδραση της με τα μιτοχόνδρια (Raj et al 1994).

2.2.4 Η ιική πρωτεΐνη E5

Η E5 πρωτεΐνη είναι μια μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη που η λειτουργία της δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Τοποθετείται στις ενδοσωμικές μεμβράνες και στην συσκευή Golgi και περιστασιακά εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες (Conrad M. et al 1993). Στα βοοειδή στελέχη των papilloma ιών η E5 πρωτεΐνη εμπλέκεται στον πρώιμο μετασχηματισμό και δρα συνδυαστικά με τον παράγοντα PDGF (Schneider-Gadicke et al 1986). Η HPV E5 έχει μικρή ομολογία με τη ομόλογη E5 πρωτεΐνη των βοοειδών (BVP) και πιθανώς λειτουργεί διαφορετικά. Έχει προταθεί ότι η E5 των HPV συνδέεται με τον υποδοχέα του EGF. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε υπερέκφραση της HPV E5 αυξάνεται η φωσφορυλίωση του υποδοχέα του EGF με συνέπεια να αναστέλλεται η αποδόμησή του (Straight et al 1993).

Η E5 εκφράζεται στο όψιμο και στο πρώιμο στάδιο της ζωής του ιού. Στο πλαίσιο ολόκληρου του γενώματος του HPV-31 έχει αποδειχθεί ότι η E5 επηρεάζει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης του EGF στα διαφοροποιημένα καθώς επίσης και στα αδιαφοροποίητα κύτταρα (Fehrmman et al 2003). Πιο συγκεκριμένα όμως η απώλεια της E5 συμβάλει στην αναστολή των όψιμων ιικών λειτουργιών στα διαφοροποιημένα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας ότι η βασική της λειτουργία εντοπίζεται στην κατηγορία αυτή των κυττάρων (Flores E.R et al 2000). Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν ότι η E5 μπορεί να εμπλέκεται στην ικανότητα του ιού να ξεφεύγει από την ανοσολογική απάντηση κρατώντας τον MHC τύπου I, στην συσκευή Golgi, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταφορά του στην κυτταρική επιφάνεια (Ashrafi et al 2005).

2.2.5 Η ιική πρωτεΐνη E6

Η E6 πρωτεΐνη των ιών υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας αποτελείται περίπου από 150 αμινοξέα και περιλαμβάνει δύο περιοχές σύνδεσης του ψευδαργύρου με το μοτίβο Cys-X-X-Cys. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι συντηρημένο μεταξύ των HPV και αποτελεί σημαντική λειτουργία για τον κύκλο ζωής του ιού (Cole and Danos, 1987). Η E6 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και έχει την δυνατότητα να συνδέεται με διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη αυτή από μόνη της είναι δυνατόν να μετασχηματίσει NIH3T3 κύτταρα και να δημιουργήσει αθάνατα ανθρώπινα μαστικά κύτταρα (Band et al 1991, Wazer et al 1995). Από μόνη της όμως η E6 δεν είναι

ικανή να μετασχηματίσει κερατινοκύτταρα . Η αποτελεσματική αθανασία των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων απαιτεί την ταυτόχρονη έκφραση των γονιδίων E6 και E7. (Hawley-Nelson et al. 1989).

Μια βασική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με την p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας καταστολέας όγκων, καθώς ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι ο αναστολέας της κίνησης της κυκλίνης p21 (Ko L. and C. Prives. 1996). Όταν το κύτταρο βρεθεί σε συνθήκες stress, όπως βλάβη στο DNA η p53 ενεργοποιείται και επάγει την έκφραση της p21, η οποία με την σειρά της αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο, δίνοντας χρόνο στο κύτταρο να επιδιορθώσει την βλάβη. Εάν η βλάβη δεν επιδιορθωθεί τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (Artandi S.E et al 2005). Όσον αφορά την σύνδεση του μονοπατιού αυτού με τον HPV έχει διαπιστωθεί, ότι η E6 προσδένεται στην p53 μαζί με την E6 ουβικουτινική λιγάση E6AP (Huibregtse et al 1991). Ο σχηματισμός αυτός του συμπλόκου οδηγεί στην ουβικουτινίωση της p53 και την αποδόμησή της στο 26 S πρωτεάσωμα. Ακόμη η E6 μπορεί να αναστείλει την δράση της p53 έμμεσα μέσω σύνδεσης της με την p300/CBP, που είναι συνενεργοποιητής της p53 (Huibregtse et al 1991).

Μια δεύτερη σημαντική λειτουργία της E6 είναι η αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες της οικογένειας PDZ. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής συνδέονται και αποδομούνται μέσω σύνδεσης τους με το C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης E6 των HPV υψηλού κινδύνου. Η αποδόμηση αυτή οδηγεί στην ανάπτυξη επιδερμικής υπερπλασίας σε πειράματα με ποντίκια (Nguyen et al 2003)

Μια ακόμα λειτουργία της E6 σημαντική για την δημιουργία αθάνατων κυττάρων είναι η ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης hTERT (Klingelutz et al 1996). Η τελομεράση είναι ένα ένζυμο με τέσσερις υπομονάδες. Βασική της δράση είναι να προσθέτει εξαμερείς επαναλήψεις στο τελομερικό άκρο των χρωμοσωμάτων. Η απώλεια της δράσης της τελομεράσης επιδρά στην σμίκρυνση των τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση οδηγώντας σταδιακά στην γήρανση των κυττάρων και τον θάνατο (Liu J.P. 1999). Η E6 φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση της hTERT μέσω συνδυαστικής δράσης μέσω c-myc και Sp1 (Kyo et al 2001). Αυτή η εκτεταμένη ενεργοποίηση της hTERT έχει σαν αποτέλεσμα την διατήρηση μεγάλων τελομερών κατά την κυτταρική διαίρεση αναστέλλοντας την κυτταρική γήρανση με άμεση συνέπεια τα κύτταρα να γίνονται αθάνατα. (Artandi S.E et al 2005).

2.2.6 Η ιική πρωτεΐνη E7

Η E7 πρωτεΐνη είναι η δεύτερη ογκοπρωτεΐνη που σχετίζεται με την δημιουργία αθάνατων κυττάρων καθώς επίσης και με την ιική παθογένεια. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μέγεθος 100 αμινοξέων και περιέχει τρεις διατηρημένες περιοχές. Την CR1, CR2 και την CR3 (Barbosa M.S et al 1990, Dyson et al 1992). Η CR1 περιοχή περιλαμβάνει το αμινοτελικό άκρο ενώ η CR2 περιέχει ένα μοτίβο LXCXE, το οποίο συμβάλει στην σύνδεση της E7 με το ρετινοβλάστωμα (Dyson et al 1992). Τέλος η CR3 αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου. Η έκφραση μόνο της E7 απουσία της E6 μπορεί να δημιουργήσει αθάνατα NIH 3T3 κύτταρα και σε χαμηλό ποσοστό να δημιουργήσει αθάνατα κερατινοκύτταρα (Munger et al 1989).

Βασική λειτουργία της E7 πρωτεΐνης είναι η δυνατότητα της να αλληλεπιδρά με την οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η οικογένεια των πρωτεϊνών του ρετινοβλαστώματος περιλαμβάνει επίσης την p107 και p130 (Dyson et al 1989). Σε επίπεδο ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου η αποφωσφορυλιωμένη μορφή της Rb δημιουργεί σύμπλοκα με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F/DP1, ο οποίος αναστέλλει την έκφραση γονιδίων που συμβάλουν στην προώθηση του κυτταρικού κύκλου στη φάση S καθώς επίσης και στην προώθηση του κυττάρου στην απόπτωση. Κατά την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S τα σύμπλοκα κυκλίνης-κινάσης φωσφορυλιώνουν την pRb με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται η Rb από το σύμπλοκο που σχηματίζει με τον μεταγραφικό παράγοντα E2F με συνέπεια να επάγεται η μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA. Όσον αφορά την δράση του ιού, η E7 συνδέεται με την Rb επάγοντας την αποικοδόμηση της Rb μέσω του μονοπατιού του ουβικουτινικού πρωτεοσώματος. (Berezutskaya et al 1997, Wang et al 2001). Η πρόσδεση της E7 στην Rb έχει ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Επιπλέον η πρωτεΐνη E7 συνδέεται με τις κυκλίνες A και E καθώς επίσης με τους αναστολείς των κυκλίνω-εξαρτώμενων κινάσεων (cdk) p21 και p27. Πιο συγκεκριμένα η E7 αυξάνει τα επίπεδα των A και E κυκλινών και μπλοκάρουν την δράση των p21, p27 με αποτέλεσμα να επάγεται η φωσφορυλίωση της Rb και κατ'επέκταση η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. (Funk J.O et al 1997).

Η τρίτη ομάδα πρωτεϊνών, που αλληλεπιδρά με την E7 είναι η απακετυλάση των ιστονών (HDACs). Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη Rb συνδέεται με τις HDACs και τις στρατολογεί στους E2F υποκινητές. Οι HDACs εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και η βασική τους λειτουργία είναι η μετακίνηση των ακέτυλο ομάδων από τις ιστόνες. Οι HDACs μπορούν επιπρόσθετα να απακετυλιώσουν τον παράγοντα E2F αναστέλλοντας την λειτουργία του. Έχει παρατηρηθεί ότι η σύνδεση της E7 στην HDAC αναστέλλει την σύνδεση της Rb-HDAC με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η λειτουργία της. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση της E7 στην HDAC έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της απακετυλίωσης του E2F. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απορύθμιση του ελέγχου σύνθεσης των HDAC με συνέπεια την εκτεταμένη αντιγραφή του ιού (Longworth M.S et al 2004, Brehm A et al 1999). Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται συνοπτικά οι ιδιότητες όλων των πρωτεϊνών του ιού.

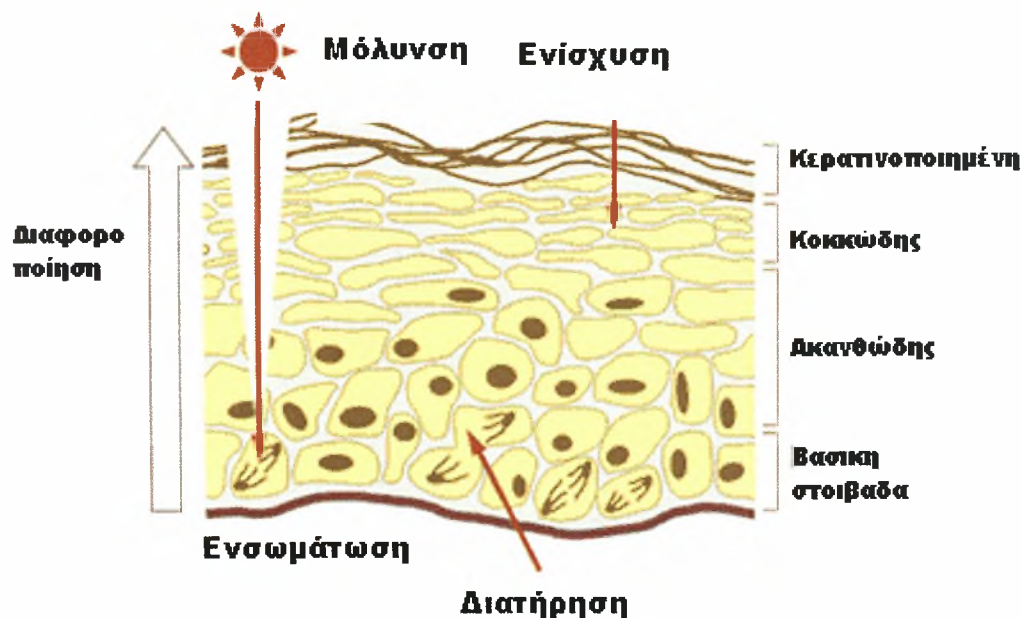
Γονίδιο:	Λειτουργία
E1	DNA- εξαρτώμενη ATP-άση, ATP εξαρτώμενη ελικάση: Επιτρέπει το ξετύλιγ ιικού γενώματος και δρα σαν παράγοντας επιμύκησης στην αντιγραφή του C
E2	Υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση στην θέση αντιγραφής. Υπά δύο μορφές: Μεταγραφικός ενεργοποιητής και μεταγραφικός κατασ Δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη E1 ρυθμίζοντας την μεταγραφή το γενώματος.
E3	Άγνωστη λειτουργία.
E4	Εκφράζεται στην όψιμη φάση μαζί με το E1 σχηματίζοντας την E1^E4 ηρ Συμβάλει στην παύση του κυτταρικού κύκλου στην φάση G2 .
E5	Καταστολή ογκοκατασταλτικών μηχανισμών π.χ φωσφορυλίωση του υποδοχ EGF.
E6	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση της p53, την αποδόμηση της οικογένειας των πρωτεϊνών PDZ, ενεργοποιεί την κατι υπομονάδα της τελομεράσης hHERT.
E7	Μετασχηματισμός των κυττάρων του ξενιστή. Αναστέλλει την δράση τη ενισχύει την δράση των κυκλινών A και E και των κινασών τους, αλληλεπιδρά απακετυλάση των ιστονών.
E8	Άγνωστη λειτουργία.
L1	Πλεονάζουσα καψιδιακή πρωτεΐνη. Υπεύθυνη για τον σχηματισμό του ιικού κα
L2	Ελάσσων καψιδιακή πρωτεΐνη. Πιθανώς εμπλέκεται στο πακετάρισμα του DNA

Πίνακας 2: Περιληπτική αναφορά όλων των λειτουργιών των πρωτεϊνών του ιού.

3. Ο κύκλος ζωής των HPV

3.1. Είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή. Πιστεύεται ότι τα ιικά σωματίδια προσβάλλουν τους επιθηλιακούς ιστούς μέσω μικροτραυματισμών, με αποτέλεσμα ο ιός να εισβάλει στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας (εικόνα 3.1). Ο ιός εισέρχεται εντός των βασικών επιθηλιακών κυττάρων, μέσω της σύνδεσης του με την θειϊκή ηπαρίνη η οποία αποτελεί συστατικό των πρωτεογλυκανών, που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη (Shafti Keramat S et al 2003). Όπως συμβαίνει και με πολλούς άλλους ιούς, ο HPV απαιτεί την παρουσία και δεύτερου υποδοχέα για την αποτελεσματική είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, όπως είναι οι α6 – ιντεγκρίνες (Yoon Cs et al 2001). Πρόσφατα έχει αποδειχθεί, ότι η λαμινίνη-5 είναι ένας ακόμα παράγοντας ικανός να λειτουργεί ως υποδοχέας των HPV στην επιφάνεια των κερατινοκυττάρων (Culp TD et al 2006).



Εικόνα 3.1. Είσοδος του ιού στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας, μετά από μικροτραυματισμό του επιθηλίου.

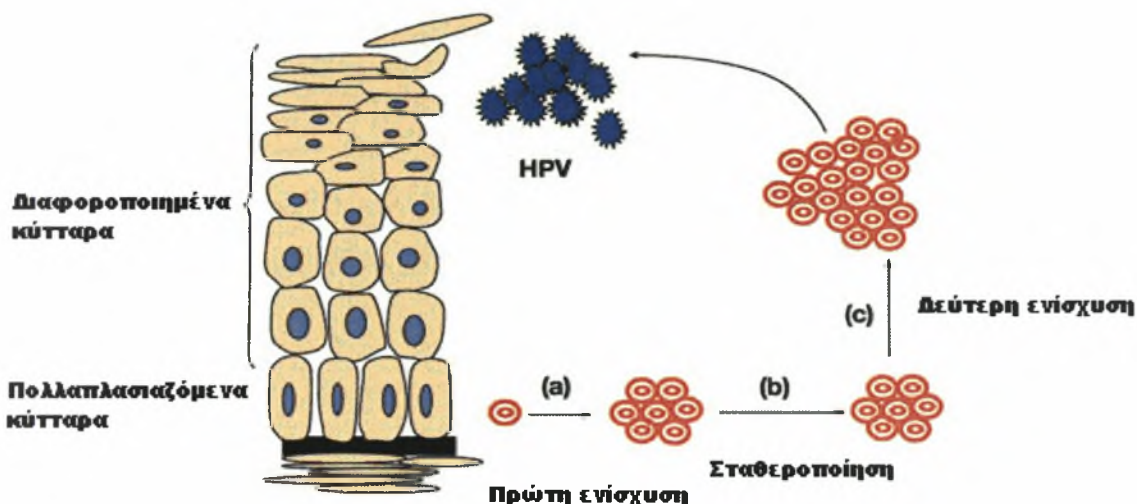
Στην συνέχεια ο ιός μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκυττάρωση σε κυστίδια κλαθρίνης ή καβεολίνης, ανάλογα με τον τύπο του

ιού. Έχει προταθεί ότι οι HPV-16 και HPV-58 εισέρχονται σε κυστίδια κλαθρίνης ενώ ο HPV-31 συνδέεται με κυστίδια καβεολίνης (Bousarghin L. et al 2003). Έπειτα τα ιικά σωματίδια αποσυναρμολογούνται στα ενδοσώματα ή/και στα λυσοσώματα και το ιικό DNA μεταφέρεται στον πυρήνα με την βοήθεια της καψιδιακής πρωτεΐνης L2. (Day P.M et al. 2004). Έχει παρατηρηθεί, ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών. Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω ρήξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις κοντά στο γονίδιο E1 (Pulido H. et al 2006).

3.2 Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Οι papilloma ιοί αντιγράφουν το γένωμα τους σε διαφορετικές περιόδους κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους και με διαφορετική συχνότητα. Σε πρώτο επίπεδο έχει προταθεί, ότι όταν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας μολυνθούν από τον ιό παρατηρείται εκτεταμένη ενίσχυση του ιικού γενώματος μεταξύ 50-400 αντιγράφων σε κάθε κύτταρο (Fields et al 1996). Σε αυτό το σημείο το ιικό γένωμα παραμένει εντός του πυρήνα ως επίσωμα. Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος συμβαίνει κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S. Στην φάση αυτή το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με το DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο.

Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέρθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων (Hoffmann R et al 2006)



Εικόνα 3.2. a) Μια πρώτη ενίσχυση του ιικού γενόματος γίνεται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας, με την παραγωγή 50-400 αντιγράφων του σε κάθε κύτταρο. b) Στην συνέχεια έχουμε σταθεροποίηση του ιικού γενόματος και η αντιγραφή του γίνεται παράλληλα με την αντιγραφή του μολυσμένου κυττάρου στην φάση S. c) Τέλος στα μολυσμένα κύτταρα των ανωτερων στοιβάδων παρατηρείται μια παρατεταμένη αντιγραφική δραστηριότητα του ιού με στόχο την παραγωγή πολυάριθμων μορίων ιικού DNA για την σύνθεση νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων.

Τα πρώτα γονίδια τα οποία εκφράζονται μετά από την μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα οποία όπως έχει αναφερθεί στην προηγούμενη ενότητα επάγουν την αντιγραφή του DNA, με την πρωτεΐνη E2 να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας την δράση των γονιδίων E6 και E7.

Έχει παρατηρηθεί ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιικού γενόματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (ρήξη και απενεργοποίηση του E2) (Corden S. A. et al 1999, Pett M. R. et al 2006) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, οι οποίες με την σειρά τους επάγουν το κυτταρικό μετασχηματισμό προκαλώντας αποσταθεροποίηση του DNA του κυττάρου, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη καρκίνου.

3.3 Διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

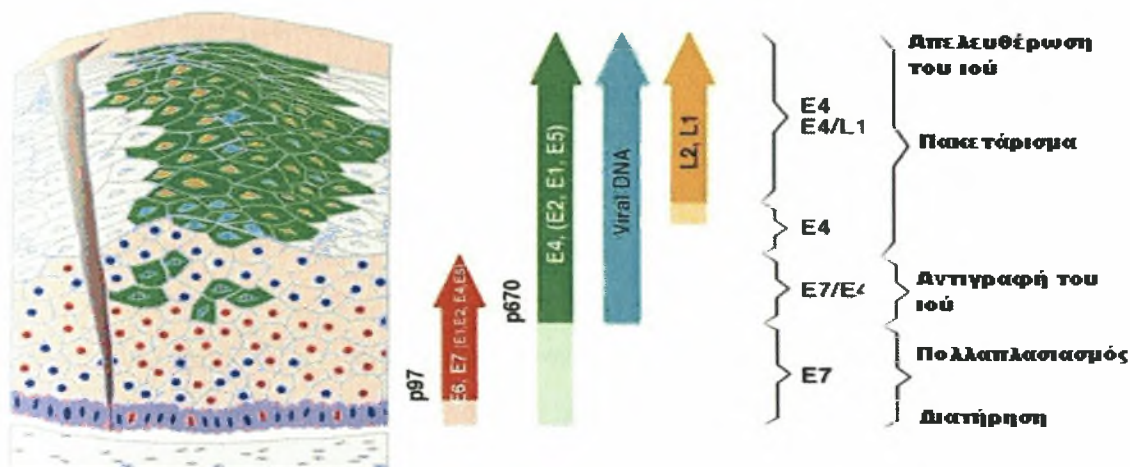
Τα ερεθίσματα τα οποία επάγουν την δημιουργία νέων ιών στην όψιμη φάση της ζωής των ιών δεν είναι πλήρως κατανοητά, αλλά φαίνεται να εξαρτώνται από αλλαγές στο κυτταρικό περιβάλλον καθώς τα μολυσμένα κύτταρα κινούνται προς την επιθηλιακή επιφάνεια.. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής

στοιβάδας οφείλεται στην έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Η ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων επιτρέπει στα μολυσμένα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς καθώς, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη ενότητα επάγουν την προώθηση του κυτταρικού κύκλου στην φάση S μέσω της αλληλεπίδρασης τους με μία σειρά παραγόντων. Επομένως τα μολυσμένα κερατινοκύτταρα χάνουν την δυνατότητα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και την ιδιότητα τους να διαφοροποιούνται (Hawley-Nelson et al. 1989) .

3.4 Μεταγραφή του ιικού γενώματος

Οι papilloma ιοί προσβάλουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του επιθηλίου. Η αντιγραφή και η έκφραση των γονιδίων του ιού εξαρτάται από το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Όμως ο μηχανισμός με τον οποίο η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων των HPV δεν είναι πλήρως κατανοητός (Zhi-Ming Zheng et al 2006).

Έχει παρατηρηθεί ότι στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα ή τα ενδιάμεσα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1, E2, E4, E5, E6, και E7) από την πρόιμη περιοχή του ιικού γενώματος. Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1, E2, E4, E5, E6, E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τον HPV-16, HPV-31 και p105 για τον HPV-18). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων. Από την άλλη πλευρά στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωμάτια. Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων (Grassmann K et al. 1996).

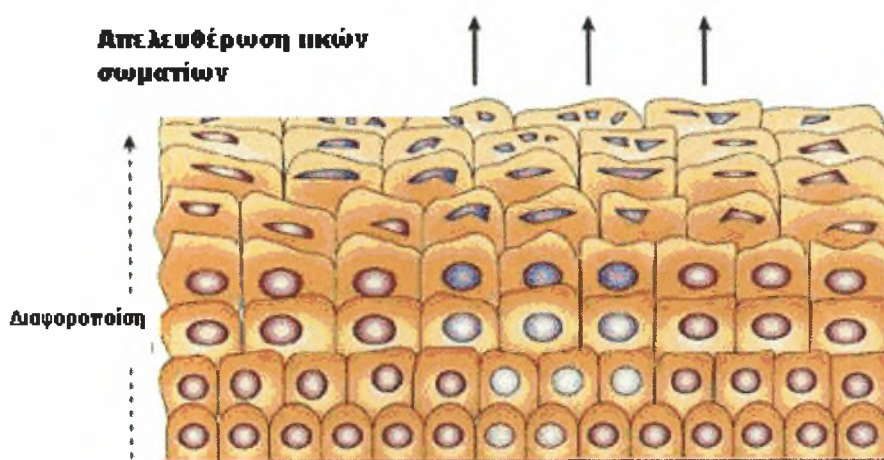


Εικόνα 3.3: Τα πρώιμα ιικά γονίδια E1, E2, E4, E5, E6, E7 εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας και βρίσκονται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού παράγοντα p97 (κόκκινο χρώμα). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών εμπλέκονται στην σταθεροποίηση και ενίσχυση του ιικού γενώματος (E1,E2) και στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (E4, E5, E6, E7). Στην όψιμη φάση της ζωής του ιού εκφράζονται τα όψιμα γονίδια L1, L2 τα οποία είναι υπεύθυνα για την σύσταση του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του γενώματος. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από την επίδραση του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο χρώμα). Επίσης τα γονίδια E1, E2, E4, E5 εκφράζονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την όψιμη φάση της ζωής του ιού ενώ συνεχίζουν να εκφράζονται και στα πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Η έκφραση των γονιδίων αυτών βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του μεταγραφικού παράγοντα p670 (πράσινο χρώμα).

3.5 Σύνθεση των ιικών σωματιδίων και απελευθέρωση του ιού

Το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των papilloma ιών περιλαμβάνει την τοποθέτηση των πολλαπλών αντιγράφων του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων και την σύνθεση των ιικών σωματιδίων. Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα εκτός από τις καψιδιακές πρωτεΐνες L1, L2 απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης E2 (Day P.M et al 1998), η οποία όπως έχει παρατηρηθεί συμβάλει στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των νεοσχηματιζόμενων καψιδίων (Buck C.B et al 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις συνδέεται άμεσα με το DNA και επάγει το πακετάρισμα του ιικού γενώματος εντός του καψιδίου (Fay A. et al 2004). Από την άλλη πλευρά η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι βασική δομική μονάδα του καψιδίου των HPV (Florin et al 2002).

Η ωρίμανση των ικών σωματίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέρθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 3.4). Οι HPV δεν προκαλούν λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων και ο ακριβής μηχανισμός απελευθέρωσης από το κύτταρο δεν είναι γνωστός (Lehr E et al 2004). Στην διαδικασία αυτή μπορεί να εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1⁺E4. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ικά σωματίδια από το κύτταρο (Roberts S. et al 1997).

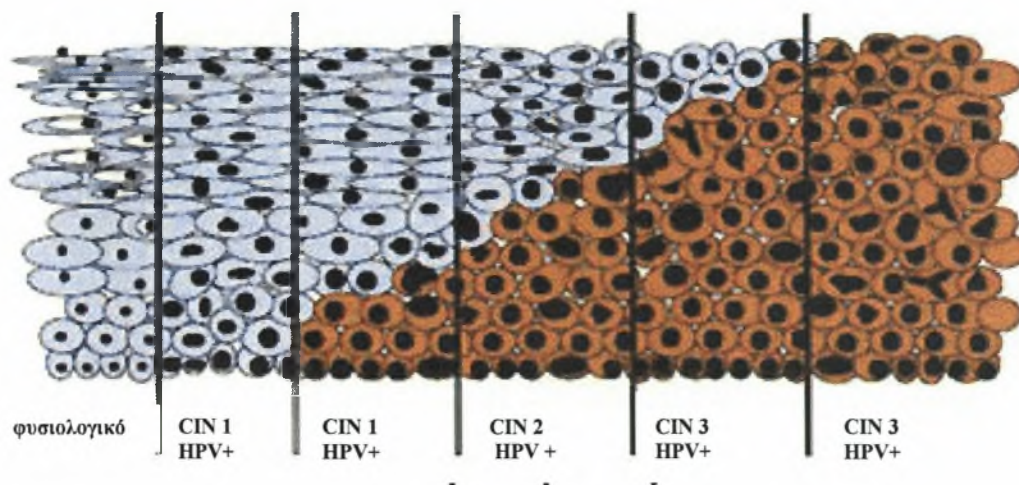


Εικόνα 3.4: Απελευθέρωση των νεοσχηματιζόμενων ικών σωματιδίων από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στα μολυσμένα κύτταρα της ανώτερης επιθηλιακής στοιβάδας..

3.6 Ιστολογικές αλλοιώσεις.

Σε μοριακό επίπεδο οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού (Mahdavi A et al 2005). Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήγη εξαλλαγή. Η κακοήγης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η έκφραση κυτταροκερατινών, γενετικές μεταλλάξεις, συμμετοχή ογκοπρωτεϊνών και ανοσολογικοί

παράγοντες του ξενιστή. Η λοίμωξη από HPV αποτελεί το εναρκτήριο γεγονός που όμως απαιτεί μακρά διαδικασία για την τελική εξέλιξη σε καρκίνο (Heise A. et al 2003).



Εικόνα 3.5 Ενδοεπιθηλιακές νεοπλασίες του τράχηλου της μήτρας (CIN)

4. Κλινικές Εκδηλώσεις

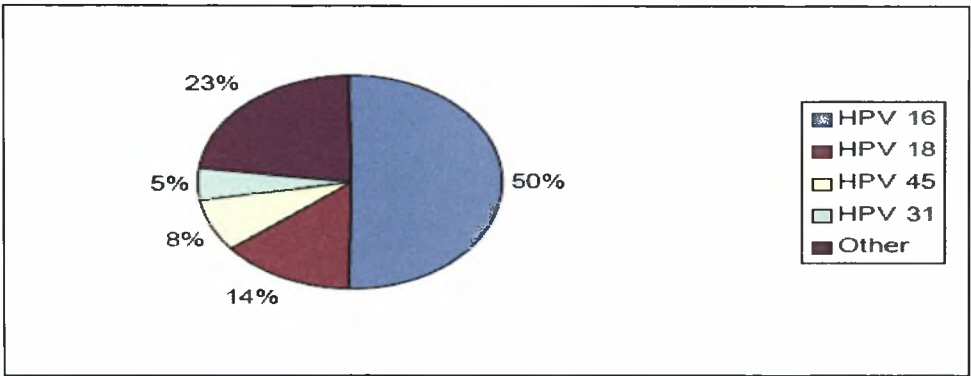
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας επηρεάζει περισσότερες από 400.000 γυναίκες ετησίως σε όλο τον κόσμο και αντιπροσωπεύει την δεύτερη πιο συχνή ένδειξη κακοήθειας στον γυναικείο πληθυσμό μετά από τον καρκίνο του μαστού (Ferlay et al 2001). Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας εντοπίζονται κυρίως στην δυτική Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Στις ΗΠΑ ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου στον τράχηλο έχει αυξηθεί κατά 80% τα τελευταία 50 χρόνια (Singer et al 1995). Αν και ο αριθμός των περιπτώσεων έχει μειωθεί σημαντικά, κάθε χρόνο σχεδόν 10.000 γυναίκες είναι θετικές στην εξέταση για καρκίνο του τραχήλου ενώ 5.000 γυναίκες πεθαίνουν από την ασθένεια (Parkin et al 2001).

Όλοι οι HPV προσβάλλουν την βασική στοιβάδα του επιθηλίου του δέρματος ή του βλεννογόνου. Όπως και πολλά από τα υπόλοιπα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα, οι HPV συνήθως προκαλούν σε αρχικό στάδιο ασυμπτωτική μόλυνση του ασθενή. Έτσι η

λοίμωξη δεν διαπιστώνεται και κατ'επέκταση δεν αντιμετωπίζεται, με αποτέλεσμα ο ιός να μπορεί να μεταδίδεται στον πληθυσμό. Παρόλα αυτά αλλοιώσεις μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μεταξύ τριών εβδομάδων και οχτώ μηνών μετά την μόλυνση με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των συμπτωμάτων στους τρεις μήνες. Η μόλυνση από τους HPV εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες και αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ανάπτυξης τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας (CIN) που μπορεί να εξελιχθεί σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

Έχει παρατηρηθεί ότι οι τύποι των HPV κατανέμονται σε διαφορετικές περιοχές με διαφορετική συχνότητα. Για παράδειγμα ο HPV-45 επικρατεί στην Δυτική Αφρική ενώ στην Κεντρική και Ανατολική Αμερική επικρατούν σε μεγαλύτερη συχνότητα οι HPV-39, HPV-54 (Bosh et al 1995).

Βάση επιδημιολογικών μελετών οι πιο επικρατείς τύποι HPV που προκαλούν τραχηλικές αλλοιώσεις και κατ'επέκταση καρκίνο είναι οι HPV-16 και HPV-18 σε ποσοστό 50% και 23 % αντίστοιχα και ακολουθούν οι HPV-45 σε ποσοστό 8%, και ο HPV-31 σε ποσοστό 5%.



Πίνακας 4.1: Αναγράφονται τα ποσοστά των τύπων HPV που ανευρίσκονται στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας (<http://www-depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>).

4.1 Τρόπος μετάδοσης των HPV.

Οι μετάδοση του ιού γίνεται μέσω δερματικής επαφής. Τα μολυσματικά ιικά σωματίδια μολύνουν τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας, τα οποία έχουν εκτεθεί στον ιό μέσω μικροτραυματισμών της επιθηλιακής στοιβάδας. Υπάρχουν τρεις τρόποι μετάδοσης του ιού:

- a) Η σεξουαλική επαφή. Οι HPV προσβάλουν με μεγαλύτερη συχνότητα γυναίκες που εναλλάσσουν πολλαπλούς συντρόφους.
- b) Μετάδοση από την μητέρα στο νεογέννητο.
- c) Χωρίς σεξουαλική επαφή (επαφή με ουρογενετικά εκκρίματα). (Fraiser 1994)

Μόλυνση με τους τύπους HPV υψηλής επικυνδυνότητας (High risk) και πιο συγκεκριμένα με τους τύπους 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, και 68, μπορεί να προκαλέσουν ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου (CIN), ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του αιδοίου (VIN), ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πέους (PIN) και ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία του πρωκτού (AIN). Αυτές είναι προ-καρκινικές δυσπλασίες και μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο (www.ebi.ac.uk). Εκτός από τους τύπους των HPV που προσβάλουν το ουρογεννητικό σύστημα έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι τύποι των papilloma ιών που σχετίζονται με την εμφάνιση μιας σειράς δερματικών παθήσεων που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του σώματος. Οι τύποι των ιών αυτών και τα συμπτώματα τους αναφέρονται συνοπτικά στον πίνακα 4.2.

Συμπτώματα	Στέλεχος
Θηλώματα του πέλματος (μυρμηγκιές)	HPV-1, 2, 4, 63
Επίπεδα θηλώματα	HPV-3, 10, 27, 28, 38, 41, 49
Μωσαϊκά θηλώματα	HPV-2, 27, 57
Epidermodisplasia Verruciformis	HPV-2, 3, 10, 12, 15, 19, 36, 46, 47, 50
Επιδερμικές αλλοιώσεις (Μη θηλωματικές)	HPV-37, 38
Αναπνευστική παπιλλομάτωση	HPV- 6, 11
Καρκίνος των πνευμόνων	HPV- 6, 11, 16, 18
Κονδυλώματα στον λάρυγγα	HPV-6, 11, 30
Καρκίνος στον λάρυγγα	HPV-16, 18
Κονδυλώματα στην κοιλότητα της γνάθου	HPV-16, 18
Στοματική επιθηλιακή υπερπλασία	HPV-13, 32
Καρκίνος στο στόμα	HPV-16, 18
Στοματική λευκοπλακία	HPV-16, 18
Καρκίνος στον οισοφάγο	HPV-16, 18
Γιγάντια κονδυλώματα (Buschke-Lowenstein tumor)	HPV-6, 11
Κοινά θηλώματα	HPV-1, 2, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65

Πίνακας 4.2: Αναφορά των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διάφορους τύπους HPV (www.ebi.ac.uk)

5. Εργαστηριακή διάγνωση.

Για την εργαστηριακή διάγνωση HPV χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα στα νοσοκομεία δύο κυρίως μέθοδοι ρουτίνας. Οι μέθοδοι αυτοί περιλαμβάνουν το pap test και το Hybrid Capture- II και έχουν συμβάλει σημαντικά στην μείωση της επίπτωσης και της επέκτασης της ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες.

5.1 Pap test

Το test Pap αποτελεί μια κυτταρολογική εξέταση για τον HPV και βασίζεται στην μικροσκοπική ανίχνευση μετασχηματισμένων από τον ιό τραχηλικών επιθηλιακών κυττάρων. Το δείγμα μπορεί να απλωθεί απευθείας σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή μπορεί να τοποθετηθεί σε διάλυμα συντήρησης. Σύμφωνα με την Food and Drug Administration (FDA) υπάρχουν δύο μέθοδοι για την παρασκευή υγρής λεπτής στιβάδας κυττάρων. Οι μέθοδοι αυτοί είναι το PrepStain σύστημα και η ThinPrep smear μέθοδος (Howell L.P et al 1998). Παρόλα αυτά η ευαισθησία των κυτταρολογικών εξετάσεων ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται κυρίως από την εμπειρία των κυτταρολόγων και τον ποιοτικό έλεγχο που εφαρμόζεται σε κάθε εργαστήριο.

5.2 Hybrid Capture II test

Στις ΗΠΑ η FDA συνιστά στις γυναίκες άνω των 30 ετών για την ανίχνευση του HPV μαζί με το pap test και την χρήση του Hybrid Capture II test. Το Hybrid Capture II test είναι μια μη ραδιενεργή μέθοδος και βασίζεται στην ενίσχυση σήματος, από τον υβριδισμό σημασμένων DNA ανιχνευτών με το DNA του HPV στόχου (Bozzeti M. Et al 2000, Loriez A.T 1996). Το παραγόμενο σήμα μετράται με χημειοφωταύγεια και εκφράζεται σε μονάδες φωτός. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται DNA ανιχνευτές, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με γενωμικές αλληλουχίες 13 τύπων υψηλής επικυνδυνότητας (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68) και 5 τύπους χαμηλής επικυνδυνότητας (HPV-6, 11, 42, 43, 44). Παρόλα αυτά διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανίχνευση των τύπων HPV με μεθόδους PCR παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην ανίχνευση HPV λοίμωξης από ότι το pap test και το Hybrid Capture- II test. (Clavel et al 2001, Cuzick et al 1999, Schiffman et al 2000).

5.3 Μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR.

5.3.1 PCR με εκκινητικά μόρια MY09/MY11 και GP5+/GP6+.

Η PCR είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση των HPV μολύνσεων. Υπάρχουν διαφορετικοί συνδυασμοί εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων DNA για την ανίχνευση των HPV. Ωστόσο οι PCR που χρησιμοποιούν εκκινητές που ενισχύουν την συντηρημένη περιοχή L1 του ιού χρησιμοποιούνται ευρέως σε κλινικές μελέτες. Τέτοια συστήματα ενίσχυσης για την ανίχνευση των HPV είναι η PCR με συνδυασμό εκκινητών MY09/MY11 (MY-PCR) και η PCR με GP5+/GP6+. Το δύο αυτά συστήματα έχουν περίπου την ίδια ευαισθησία αλλά διαφέρουν στην αξιοπιστία ανίχνευσης σε κάποιους τύπους HPV. Το MY09/MY11 είναι ένα μείγμα 25 εκκινητών ικανών να ενισχύσουν ένα ευρύ φάσμα τύπων HPV. Τα προϊόντα της MY-PCR έπειτα από ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόξης μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη και να υποβληθούν σε υβριδισμό με ραδιοσημασμένους ανιχνευτές ειδικούς για τους διάφορους τύπους HPV. Τέλος οι μεμβράνες εμφανίζονται με αυτοραδιογραφία. Γενικά το σύστημα MY09/MY11 φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστο για τον εντοπισμό πολλαπλών μολύνσεων (Weimin Qu et al 1997).

5.3.2. PCR σε συνδυασμό με Microarrays.

Ακόμη ένας τρόπος για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV με μεγάλη ακρίβεια είναι αυτός του συνδυασμού της απλής PCR με τη μέθοδο των Microarrays. Τα microarrays είναι μια νέα μέθοδος που χρησιμοποιεί τον υβριδισμό των σημασμένων τμημάτων DNA του δείγματος με ολιγονουκλεοτίδια που βρίσκονται ακινητοποιημένα σε μια πλάκα η οποία διαβάζεται από ένα scanner. Η μέθοδος που κάνει χρήση της PCR και των microarrays ονομάζεται PCR/APEX. Η PCR/APEX χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των HPV υψηλού κινδύνου με την ενίσχυση του E7 γονιδίου του ιού. Το E7 είναι αρκετά συντηρημένο σε κάποια σημεία του γονιδίου αλλά και αρκετά ποικιλόμορφο σε κάποια άλλα ώστε να επιτρέπει την ταυτοποίηση. Στην μέθοδο της PCR/APEX αρχικά πραγματοποιείται μια multiplex PCR με διαφορετικούς primers για κάθε τύπο HPV. Στην συνέχεια τα προϊόντα μετά από ειδική επεξεργασία τοποθετούνται σε microarray chip με αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε ένα τμήμα του γονιδίου E7 για να λάβει μέρος ο υβριδισμός. Μετά τον υβριδισμό το chip ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τυχόν μη υβριδοποιημένα νουκλεοτίδια

και σαρώνεται για να εντοπιστούν οι θέσεις υβριδισμού που φθορίζουν δίνοντας έτσι σήμα που επεξεργάζεται από κατάλληλο λογισμικό. Το σήμα που λαμβάνεται αναλύεται ώστε να αναδειχθούν οι συμπληρωματικές αλληλουχίες που χαρακτηρίζουν τον τύπο του HPV (Gheit T. et al 2006).

5.3.3 Real time PCR

Εκτός από τις κλασσικές μεθόδους PCR, για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV, χρησιμοποιείται επίσης η ‘real time PCR’. Με την μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου σε πρώιμα μετασχηματισμένα ή καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα. Οι ανιχνευτές και τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια της μεθόδου είναι σχεδιασμένα, έτσι ώστε να ανιχνεύουν και να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο ιού τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6-E7 των HPV υψηλής επικινδυνότητας. Τα γονίδια αυτά είναι αρκετά συντηρημένα ανάμεσα στους ογκογόνους τύπους των HPV και παραμένουν άθικτα και στην επισωματική μορφή και στην ενσωματωμένη τους μορφή στο γένωμα του ξενιστή. Εκτός από την υπερβολική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου η διαδικασία της real time PCR δίνει την δυνατότητα στον χρήστη να παρακολουθεί την αντίδραση της PCR σε πραγματικό χρόνο.

5.3.4. Nested Multiplex PCR.

Μια σημαντική μέθοδο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των HPV είναι η Nested Multiplex PCR, η οποία εφαρμόζεται και στο εργαστήριο μας. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιούνται εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των ογκογονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV υψηλού κινδύνου. Από την διαδικασία δημιουργείται ένας σημαντικός αριθμός αντιγράφων των γονιδίων E6 και E7, με αποτέλεσμα να υπάρχει αρκετά διαθέσιμο υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με Nested Multiplex PCR. Στην Nested Multiplex PCR χρησιμοποιούνται εν συνεχεία τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια, τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα των ήδη ενισχυμένων από την πρώτη PCR ογκογονιδίων E6 και E7. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να γίνει η ακριβής ταυτοποίηση του ιού . Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές συνήθως χρησιμοποιούνται σε

μείγματα (cocktails). Εντός των μειγμάτων οι τύπο-ειδικοί εκκινητές οργανώνονται μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους (Sotlar K. et al 2004).

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Κλινικά δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 71 κλινικά δείγματα από τραχηλικά επιχρίσματα, τα οποία προσφέρθηκαν από το αντικαρκινικό νοσοκομείο Αγ. Σάββας. Τα δείγματα αυτά συλλέχθηκαν την χρονική περίοδο 2003-2005 σε υγρό μέσο ThinPrep και διατηρήθηκαν στους -20°C. Η κωδικοποίηση των δειγμάτων παρουσιάζεται στον πίνακα 6.1

Δείγματα							
659	677	699	717	739	757	831	875
663	678	700	721	743	759	838	878
665	684	703	725	745	768	841	879
666	688	704	727	746	770	843	884
667	689	706	730	747	774	852	885
673	690	709	731	748	793	855	896
674	691	710	732	751	795	858	897
675	694	712	736	752	796	868	899
676	696	715	738	756	825	869	

Πίνακας 6.1: Κωδικοποίηση κλινικών δειγμάτων.

6.2 Προετοιμασία DNA.

Η απομόνωση DNA από τα κλινικά δείγματα έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) σύμφωνα με τον Casas I. et al, 1996. Από κάθε κολπικό επίχρισμα χρησιμοποιήθηκαν 100 µl, τα οποία αναμιχθήκαν καλά με γλυκογόνο 20µg/tube και Lysis Buffer 600µl (GuSCN 4M, N-lauroyl sacrosine 0,5%, Dithiotreitol 1mM, sodium citrate 25 mM) και επώστηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 400 µl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C), καλή ανάδευση των δειγμάτων και επώση για 20 min στους +4°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf στους +4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύσιμο του ιζήματος με 500µl 70% παγωμένης αιθανόλης. Έπειτα ακολούθησε καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000 rcf

στους +4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε πλήρως και το ίζημα, το οποίο περιέχει το εκχειλισμένο κυτταρικό και ιικό DNA επαναδιαλύθηκε σε 100 µl ddH₂O (RNase, Dnase free, Sigma Aldrich Inc, St Louis USA). Το απομονωμένο DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω χρησιμοποίηση του.

6.3 Εκκινητικά μόρια PCR

Η παρούσα μελέτη βασίστηκε στην δημοσίευση του K.Sotlar και συνεργατών 2004. Όλα τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν σε ενίσχυση PCR με έναν «forward primer» GPE6- 3F, και δύο back primers GPE6-5B και GPE6-6B για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και E7 όλων των HPV που μπορεί να περιλαμβάνονται στα κολπικά επιχρίσματα. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύεται από τους συγκεκριμένους primers είναι της τάξης των 630bp.

Εκκινητές	Αλληλουχίες	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
GPE6-3F	GGG W GK KAC TGA AAT CGG T	630
GPE6-5B	CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA	
GPE6-6B	TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC	

Πίνακας 6.2: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR

6.4 Τύπο-ειδικοί εκκινητές για Nested Multiplex PCR.

Για την ενίσχυση της ευαισθησίας πραγματοποιήθηκε Nested Multiplex PCR. Τα GPE6 PCR προϊόντα των κλινικών δειγμάτων ενισχύθηκαν με Nested PCR με τύπο-ειδικούς εσωτερικούς εκκινητές, οι οποίοι επιλέχθηκαν για να επιτευχθεί η ακριβής τυποποίηση του HPV. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να είναι δυνατή η ακριβής ανίχνευση ενός ευρέως φάσματος HPV γονοτύπων, συμπεριλαμβανομένων όλων των τύπων υψηλού κινδύνου. Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά μίγματα τύπο-ειδικών εκκινητών όπως φαίνεται και στον πίνακα 6.3.

Μίγμα εκκινητών	Εκκινητές	Αλληλουχίες	HPV γονότυπος	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
1	16F 16R	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	16	457
	68F 68R	GCA GAA GGC AAC TAC AAC GG GTT TAC TGG TCC AGC AGT GG	68	333
	31F 31R	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	31	263
	59F 59R	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	59	215
	33F 33R	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	33	398
	6/11F 6/11R	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	6/11	334
2	58F 58R	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	58	274
	52F 52R	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	52	229
3	35F 35R	CAA CGA GGT AGA AGA AAG CAT C CCG ACC TGT CCA CCG TCC ACC G	35	358
	18F 18R	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	18	322
	51F 51R	GAG TAT AGA CGT TAT AGC AGG TTT CGT TAC GTT GTC GTG TAC G	51	223
	66F 66R	TTC AGT GTA TGG GGC AAC AT AAA CAT GAC CCG GTC CAT GC	66	172
	45F 45R	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	45	151

Πίνακας 6.3. Αναφορά των μιγμάτων των εκκινητών για την πραγματοποίηση της Nested Multiplex PCR.

6.5 Πλασμίδια

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της PCR χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες πλασμίδια, τα οποία περιέχουν το Ε6 γονίδιο διαφορετικών τύπων HPV. Αυτά ήταν για τους HPV-33, 66, 68. Τα πλασμίδια αυτά ήταν ευγενική προσφορά του Dr. M. Favre, Unite des Papillomavirus Institut Pasteur Paris. Ακόμη χρησιμοποιήθηκαν 3 πλασμίδια τα οποία περιείχαν το γονίδιο Ε6 των HPV-6, 16, 31, από την εταιρία AB ANALITICA.

6.6 PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β- γλοβουλίνης

Για την επιβεβαίωση της παρουσίας κυτταρικού DNA σε όλα τα κλινικά δείγματα και για την διαπίστωση ότι η διαδικασία της εκχύλισης έχει πραγματοποιηθεί σωστά και ότι τα δείγματα δεν περιέχουν αναστολείς της PCR πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης ενός ‘housekeeping’ γονιδίου. Για την διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια GH20 (5’-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3’) και PC04 (5’-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3’)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 2 μl εκκινητικών μορίων (PC04/GH20) συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα.

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
PC04/GH20	Θερμοκρασία αποδιάταξης : 94°C για 30sec
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης : 40°C για 30sec
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 60sec
} 35 cycles	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Η PCR που πραγματοποιήθηκε περιέχει έναν θετικό μάρτυρα από DNA κυττάρων απομονωμένο από κυτταροκαλλιέργειες MRC5 και Rd. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases.

6.7 PCR με εκκινητικά μόρια: GPE6- 3F, GPE6-5B και GPE6-6B

Στην συνέχεια αφού διαπιστώθηκε, ότι η διαδικασία της εκχύλισης έχει πραγματοποιηθεί σωστά και το DNA των κλινικών δειγμάτων ήταν κατάλληλο για την περαιτέρω χρησιμοποίηση του ακολουθήθηκε το κυρίως ερευνητικό μέρος, το οποίο περιλαμβάνει μια πρώτη PCR με τα εκκινητικά μόρια GPE6- 3F, GPE6-5B και GPE6-6B. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να ενισχύουν τις περιοχές των ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης των γονιδίων E6 και E7 των πιο συχνά εμφανιζόμενων γονοτύπων HPV. Επίσης από την διαδικασία αυτή δημιουργείτε αρκετό υλικό για να ενισχυθεί ξανά το προϊόν της PCR αυτής με Nested Multiplex PCR, χρησιμοποιώντας για την μέθοδο αυτή τρία μείγματα τύποι-ειδικών εκκινητικών μορίων. Η όλη διαδικασία βασίστηκε στην δημοσίευση του K.Sotlar και συνεργατών 2004 και μέσω μιας σειράς αλλαγών οι τελικές συνθήκες της PCR και της Nested Multiplex PCR που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl. Το μείγμα περιείχε από: 3 μl DNA από κάθε δείγμα, 3 μl εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 25 pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 6 μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2,5U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως αναγράφονται στον πίνακα..

Εκκινητικά μόρια	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης		
GPE63F, -5B, -6B	Θερμοκρασία αποδιάταξης :	94°C για 30sec	} 25 cycles
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης :	50°C για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης:	72°C για 60sec	

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases ενώ ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια που φέρουν στο εσωτερικό τους το γονίδιο E6 των στελεχών HPV- 6, 16, 31, 33, 66, 68.

6.8 Nested Multiplex PCR με τρία μείγματα εκκινητών.

Στην συνέχεια όλα τα δείγματα τα οποία ενισχύθηκαν με την πρώτη PCR ενισχύθηκαν ξανά με Nested PCR, χρησιμοποιώντας τρία μείγματα εσωτερικών τύπο-ειδικών εκκινητικών μορίων. Τα τύπο-ειδικά εκκινητικά μόρια είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήματα των ενισχυμένων από την πρώτη PCR γονιδίων E6 και E7, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ακριβή ταυτοποίηση του ιού. Τα μείγματα των εκκινητικών μορίων για την πραγματοποίηση της Nested Multiplex PCR αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 6.3. Εντός των μειγμάτων οι τύπο-ειδικοί εκκινητές οργανώνονται μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους.

Η αντίδραση της Nested Multiplex PCR πραγματοποιήθηκε στα 50μl. Το μείγμα περιείχε από: 2 μl DNA από κάθε δείγμα, 4 μl του μείγματος των εκκινητικών μορίων τελικής συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Paq reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2.5 U Paq DNA πολυμεράση και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf Master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 2 λεπτά και στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών για κάθε μίγμα εκκινητών ξεχωριστά όπως αναγράφονται στον πίνακα..

Μείγμα Εκκινητών	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης		
Μείγμα 1	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	94°C για 30sec	30 cycles
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	50°C για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης :	72°C για 60sec	
Μείγμα 2	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	94°C για 30sec	30 cycles
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	55°C για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης :	72°C για 60sec	
Μείγμα 3	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	94°C για 30sec	30 cycles
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	50°C για 30sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης :	72°C για 60sec	

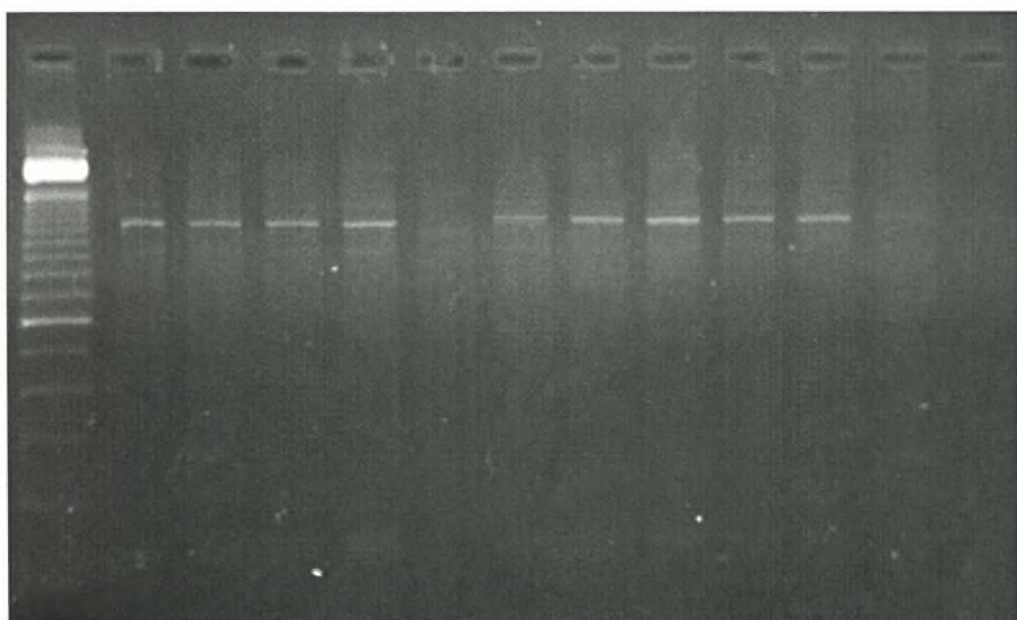
Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases καθώς επίσης και κύτταρα Rd.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων Nested Multiplex PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν κάθε Nested Multiplex PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2 μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 200V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της Nested Multiplex PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne) ενώ η ταυτοποίηση κάθε τύπου HPV έγινε βάση του μεγέθους των προϊόντων.

7. Αποτελέσματα

7.1 Αποτελέσματα PCR β-γλοβουλίνης.

Στην εικόνα 7.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης εννέα κλινικών δειγμάτων. Όλα τα κλινικά δείγματα υποβλήθηκαν στην διαδικασία αυτή για τον έλεγχο της ύπαρξης DNA καθώς επίσης και για τον έλεγχο της ποιότητας του κυτταρικού DNA, έτσι ώστε να είναι δυνατή η περαιτέρω χρησιμοποίησή τους για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.



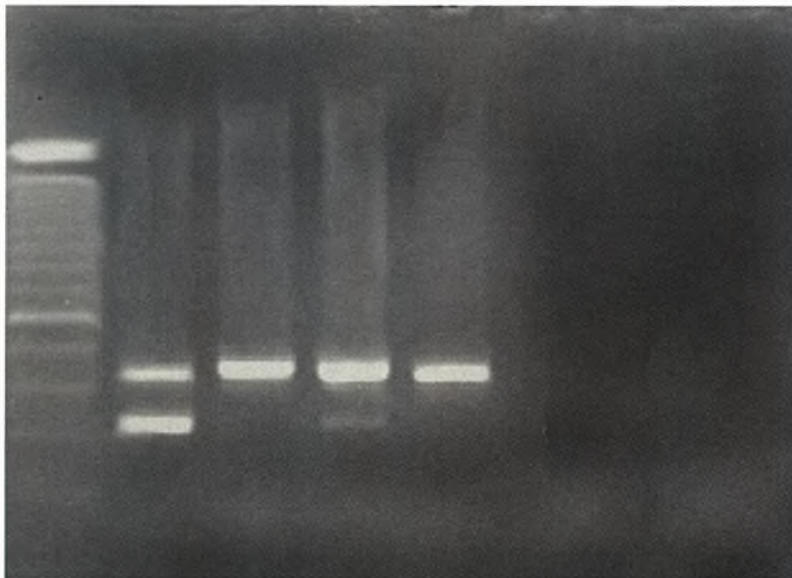
Εικόνα 7.1. Αποτελέσματα PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της β-γλοβουλίνης.

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι τα συγκεκριμένα κλινικά δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς όλες οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο σωστό ύψος σύμφωνα με το μάρτυρα μοριακού βάρους των 100bp της εταιρίας Invitrogen. Ο μάρτυρας μοριακού βάρους της Invitrogen δείχνει το μοριακό βάρος κάθε ζώνης, η οποία απέχει από την γειτονική της 100bp. Επίσης από την παραπάνω εικόνα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η διαδικασία της PCR έγινε σωστά καθώς έχουν ενισχυθεί οι θετικοί μάρτυρες (θέσεις 6 και 12), οι οποίοι είναι κύτταρα Rd και MRC-5 αντίστοιχα που περιέχουν στο εσωτερικό του γονιδιώματος τους το γονίδιο της β-γλοβουλίνης. Ακόμη ο αρνητικός μάρτυρας που είναι

ddH₂O (θέση 13) δεν έχει δώσει σήμα ενίσχυσης γεγονός που δείχνει ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση στην διαδικασία. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε και για τα 71 κλινικά δείγματα.

7.2 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το πρώτο μείγμα εκκινητικών μορίων.

Στην εικόνα 7.2 παρατηρούνται τα αποτελέσματα της Nested Multiplex PCR που πραγματοποιήθηκε με το πρώτο μείγμα εκκινητικών μορίων, όπως αναγράφεται στον πίνακα 6.4. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα της πρώτης PCR για την ενίσχυση των γονιδίων E6 και E7 όλων των στελεχών HPV δεν υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση. Αυτό συμβαίνει διότι ο αριθμός των ενισχυμένων τμημάτων των γονιδίων E6 και E7 από την διαδικασία της πρώτης PCR είναι σε χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα να μην παίρνουμε σήμα κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Ακόμη η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων δεν πραγματοποιείται καθώς αποφεύγεται με αυτόν τον τρόπο η επιμόλυνση της αντίδρασης (Nested Multiplex PCR).



Εικόνα 7.2: Ενδεικτική εικόνα της NMPCR από το πρώτο μείγμα εκκινητικών μορίων από τρία κλινικά δείγματα στις θέσεις 2, 3, και 4 αντίστοιχα. Στην θέση 5 έχει τοποθετηθεί ως θετικός μάρτυρας πλασμίδιο στο εσωτερικό του οποίου έχει τοποθετηθεί το γονίδιο E6 του HPV-16, ενώ στις θέσεις 6 και 7 έχουν τοποθετηθεί αρνητικοί μάρτυρες-πλασμίδια στο εσωτερικό των οποίων βρίσκεται το γονίδιο E6 των HPV-33 και HPV-66 αντίστοιχα. Τέλος στην θέση 8 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε τα προϊόντα τριών ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων, τα οποία όπως έχει αναφερθεί έχουν ενισχυθεί με Nested Multiplex PCR με το πρώτο μείγμα εκκινητικών μορίων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα ξεχωριστά. Το μείγμα των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι γονότυποι που ενισχύονται από τους εκκινητές αυτούς αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Μείγμα εκκινητών	Εκκινητές	HPV γονότυπος	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
1	16F 16R	16	457
	68F 68R	68	333
	31F 31R	31	263
	59F 59R	59	215

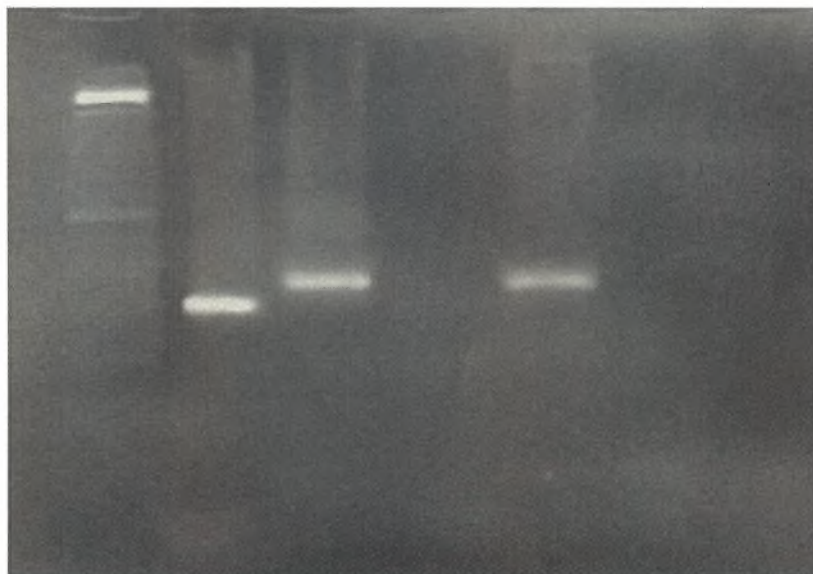
Πίνακας 7.1: Αναφορά των εκκινητικών μορίων, των γονότυπων και του μήκους των ενισχυμένων τμημάτων του πρώτου μείγματος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της NMPCR.

Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 7.2) βλέπουμε ότι τα δείγματα που βρίσκονται στις θέσεις 2 και 4 παρουσιάζουν δύο σήματα ενίσχυσης, τα οποία σύμφωνα με την δημοσίευση ταυτοποιούν τον HPV- 16 και HPV-68. Το πρώτο σήμα της Nested Multiplex PCR αυτών των δειγμάτων βάση του μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen αντιστοιχεί στις 457 bp, γεγονός που ταυτοποιεί το στέλεχος HPV- 16 σύμφωνα με την δημοσίευση του K.Sotlar και των συνεργατών του. Το δεύτερο σήμα ενίσχυσης των δύο δειγμάτων σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους αντιστοιχεί στις 333bp γεγονός που ταυτοποιεί βάση της δημοσίευσης τον HPV-68. Επομένως τα δύο αυτά κλινικά δείγματα φέρουν διπλή μόλυνση από δύο διαφορετικά στελέχη HPV. Επίσης το δείγμα στην θέση 3 παρουσιάζει ένα σήμα ενίσχυσης που βρίσκεται στο ύψος των 457bp και ταυτοποιεί τον HPV- 16. Ακόμη στην θέση 5 έχει τοποθετηθεί το προϊόν ενίσχυσης του θετικού μάρτυρα, ο οποίος όπως έχει αναφερθεί είναι πλασμίδιο που φέρει στο εσωτερικό του το γονίδιο E6 του HPV-16. Επομένως από την εικόνα αυτή βλέπουμε ότι ο θετικός μάρτυρας έχει λειτουργήσει γεγονός που σημαίνει ότι η αντίδραση της NMPCR έχει λειτουργήσει κανονικά. Στις θέσεις 6 και 7 έχουν τοποθετηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες πλασμίδια που φέρουν στο εσωτερικό τους το γονίδιο E6 του HPV-33 και HPV-66 αντίστοιχα, ενώ στην θέση 8 έχει τοποθετηθεί ως

αρνητικός μάρτυρας ddH₂O Τα δείγματα που φέρουν τους αρνητικούς μάρτυρες δεν έχουν δώσει σήματα ενίσχυσης. Από τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων του θετικού και των αρνητικών μαρτύρων είμαστε σε θέση να πούμε ότι οι αντιδράσεις PCR και NMPCR έχουν λειτουργήσει επιτυχώς χωρίς επιμολύνσεις γεγονός που πιστοποιεί, ότι η διαδικασία της ταυτοποίησης είναι έγκυρη χωρίς την ύπαρξη ψευδώς θετικών και ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

7.3 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το δεύτερο μείγμα εκκινητικών μορίων.

Στην εικόνα 7.3 παρατηρούμε τα προϊόντα ενίσχυσης με Nested Multiplex PCR με το δεύτερο μείγμα εκκινητικών μορίων δύο ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων



Εικόνα 7.3: Ενδεικτική εικόνα της NMPCR από το δεύτερο μείγμα εκκινητικών μορίων από δύο ενδεικτικά κλινικά δείγματα στις θέσεις 2 και 3 αντίστοιχα. Στις θέσεις 4 και 6 έχουν τοποθετηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες πλασμίδια στο εσωτερικό των οποίων έχει τοποθετηθεί το γονίδιο E6 των στελεχών HPV-16 και HPV-66 αντίστοιχα. Στην θέση 5 έχει τοποθετηθεί θετικός μάρτυρας πλασμίδιο στο εσωτερικό του οποίου βρίσκεται το γονίδιο E6 του HPV-33. Τέλος στην θέση 7 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Το μείγμα των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι γονότυποι που ενισχύονται από τους εκκινητές αυτούς αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

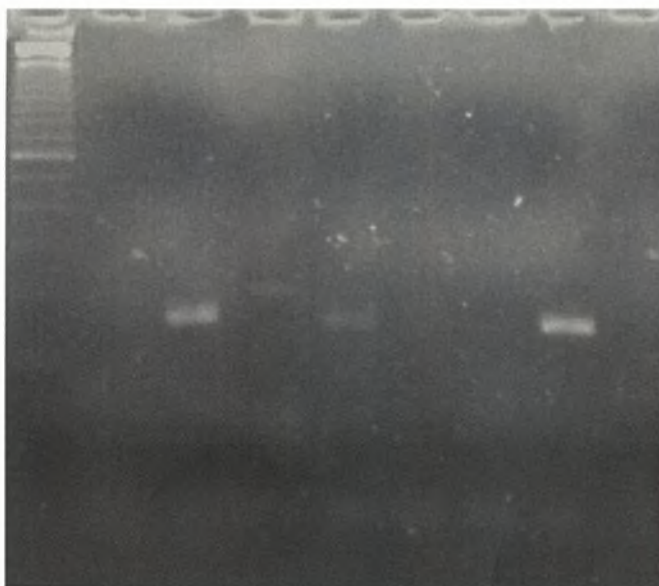
Μίγμα εκκινητών	Εκκινητές	HPV γονότυπος	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
2	33F 33R	33	398
	6/11F 6/11R	6/11	334
	58F 58R	58	274
	52F 52R	52	229

Πίνακας 7.2: Αναφορά των εκκινητικών μορίων, των γονότυπων και του μήκους των ενισχυμένων τμημάτων του δεύτερου μείγματος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της NMPCR.

Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 7.3) παρατηρούμε, ότι το δείγμα στην θέση 2 παρουσιάζει μια ζώνη ενίσχυσης που αντιστοιχεί σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους στις 334bp και βάση της δημοσίευσης του K.Sotlar και των συνεργατών του ταυτοποιεί, το στέλεχος HPV-6/11 ενώ το δείγμα στην θέση 3 παρουσιάζει μια ζώνη ενίσχυσης στις 398bp που αντιστοιχεί στο στέλεχος HPV-33. Στις θέσεις 4 και 6 έχουν χρησιμοποιηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες πλασμίδια που φέρουν το γονίδιο E6 των στελεχών HPV-16 και HPV-66 αντίστοιχα ενώ στην θέση 7 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Στην θέση 5 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας πλασμίδιο που φέρει στο εσωτερικό του το γονίδιο E6 του HPV-33. Ο θετικός αυτός μάρτυρας έχει δώσει σήμα ενίσχυσης στο σωστό ύψος σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους γεγονός που επαληθεύει, ότι η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς. Από τον συνδυασμό των σημάτων των αρνητικών μαρτύρων και του θετικού μάρτυρα συμπεραίνουμε ότι η αντιδράσεις PCR και NMPCR έχουν πραγματοποιηθεί κανονικά χωρίς επιμολύνσεις και χωρίς την ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα ξεχωριστά.

7.4 Αποτελέσματα Nested Multiplex PCR με το τρίτο μείγμα εκκινητικών μορίων.

Σύμφωνα με την εικόνα 7.4 βλέπουμε τα προϊόντα ενίσχυσης τεσσάρων ενδεικτικών κλινικών δειγμάτων με Nested Multiplex PCR με το τρίτο μείγμα εκκινητικών μορίων.



Εικόνα 7.4: Ενδεικτική εικόνα της NMPCR από το τρίτο μείγμα εκκινητικών μορίων από τρία κλινικά δείγματα στις θέσεις 3, 4 και 5 αντίστοιχα. Στις θέσεις 6 και 7 έχουν τοποθετηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες πλασμίδια στο εσωτερικό των οποίων έχει τοποθετηθεί το γονίδιο E6 των στελεχών HPV-16 και HPV-33 αντίστοιχα. Στην θέση 8 έχει τοποθετηθεί θετικός μάρτυρας πλασμίδιο στο εσωτερικό του οποίου βρίσκεται το γονίδιο E6 του HPV-66. Τέλος στην θέση 9 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O.

Το μείγμα των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι γονότυποι που ενισχύονται από τους εκκινητές αυτούς αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα

Μίγμα εκκινητών	Εκκινητές	HPV γονότυπος	Ενισχυμένο τμήμα (bp)
3	35F 35R	35	358
	18F 18R	18	322
	51F 51R	51	223
	66F 66R	66	172
	45F 45R	45	151

Πίνακας 7.3: Αναφορά των εκκινητικών μορίων, των γονότυπων και του μήκους των ενισχυμένων τμημάτων του τρίτου μείγματος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση της NMPCR.

Στην παραπάνω εικόνα (εικόνα 7.4) παρατηρούμε ότι τα δείγματα στις θέσεις 3 και 5 έχουν δώσει μια ζώνη ενίσχυσης σύμφωνα με τον μάρτυρα μοριακού βάρους στις 172bp που αντιστοιχεί σύμφωνα με την δημοσίευση στο στέλεχος HPV-66 ενώ το δείγμα στην θέση 4 παρουσιάζει μια ζώνη ενίσχυσης στις 223bp που αντιστοιχεί στο στέλεχος HPV-51. Στις θέσεις 6 και 7 έχουν χρησιμοποιηθεί ως αρνητικοί μάρτυρες πλασμίδια που φέρουν στο εσωτερικό τους το γονίδιο E6 του HPV-16 και HPV-33 αντίστοιχα, ενώ στην θέση 9 έχει χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας ddH₂O. Οι αρνητικοί αυτοί μάρτυρες δεν έχουν δώσει σήμα ενίσχυσης γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αντιδράσεις δεν φέρουν επιμολύνσεις. Στην θέση 8 έχει χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας πλασμίδιο που φέρει στο εσωτερικό του το γονίδιο E6 του HPV-66. Το δείγμα που περιέχει τον μάρτυρα αυτό φέρει έντονο σήμα στο σωστό ύψος,. Από τον συνδυασμό των σημάτων του θετικού μάρτυρα και των αρνητικών μαρτύρων συμπεραίνουμε ότι οι αντιδράσεις PCR και NMPCR έχουν λειτουργήσει κανονικά χωρίς επιμολύνσεις και χωρίς την ύπαρξη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για όλα τα κλινικά δείγματα ξεχωριστά.

Τα αποτελέσματα για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των HPV υψηλού κινδύνου από τα συνολικά 71 κλινικά δείγματα με την βοήθεια της Nested Multiplex PCR παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

	PC04/GH20	Primer mix 1	Primer mix 2	Primer mix 3
659	+	HPV - 16 (457 bp)	-	-
663	+	-	-	-
665	+	-	-	HPV -18 (322 bp) HPV-66 (172 bp)
666	+	-	-	-
667	+	-	-	-
673	+	-	-	-
674	+	-	-	-
675	+	-	-	-
676	+	-	-	-
677	+	-	-	-
678	+	-	-	-
684	+	-	-	-
688	+	-	-	-
689	+	-	-	-
690	+	-	-	-
691	+	-	-	-
694	+	-	-	-
696	+	-	-	-
699	+	-	-	-
700	+	-	-	-
703	+	-	-	-
704	+	-	-	-
706	+	-	-	-
709	+	-	-	-
710	+	HPV - 16 (457 bp)	-	-
712	+	-	-	-
715	+	-	-	-
717	+	-	-	-
721	+	-	-	-
725	+	-	-	-
727	+	-	-	-
730	+	-	-	-
731	+	-	-	-
732	+	-	-	-
736	+	-	-	-
738	+	-	-	-
739	+	HPV - 16 (457 bp)	-	HPV - 18 (322bp)
743	+	-	-	-
745	+	-	-	-
746	+	-	-	-
747	+	HPV - 16 (457 bp)	HPV - 6/11 (334 bp)	HPV - 18 (322bp)

748	+	-	-	-
751	+	-	-	-
752	+	-	-	HPV - 51 (223 bp)
756	+	-	-	-
757	+	-	-	-
759	+	-	-	-
768	+	-	-	-
770	+	-	-	-
774	+	-	-	-
793	+	HPV - 16 (457 bp)	-	HPV - 66 (172 bp)
795	+	HPV - 16 (457 bp)	-	-
796	+	HPV - 16 (457 bp)	-	HPV - 66 (172 bp)
825	+	HPV - 16 (457 bp)	HPV - 6/11 (334 bp)	-
831	+	-	-	-
838	+	-	-	-
841	+	-	-	-
843	+	-	-	-
852	+	-	-	-
855	+	HPV - 68 (333 bp)	-	-
858	+	HPV - 16 (457 bp)	-	-
868	+	HPV - 16 (457 bp)	-	HPV - 66 (172 bp)
869	+	-	-	-
875	+	-	-	-
878	+	-	-	-
879	+	HPV - 68 (333 bp)	-	-
884	+	-	-	-
885	+	HPV - 68 (333 bp)	-	-
896	+	-	-	-
897	+	-	-	-
899	+	-	-	-

Πίνακας 7.4: Παρουσίαση όλων των αποτελεσμάτων της Nested Multiplex PCR με τα τρία μείγματα εκκινητικών μορίων στο σύνολο των 71 κλινικά δειγμάτων.

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα η διάγνωση μολύνσεων από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) βασίζεται στην ανίχνευση του ιικού DNA. Περιοχές σε διαφορετικά μέρη του γενώματος του ιού έδωσαν την δυνατότητα σύνθεσης μιας σειράς εκκινητικών μορίων, όπως είναι οι MY09-MY11, PGMY09-MY11, GP5+-GP6+, SPF10, και LCR-E7 (Gravit et al 2000, Jacobs et al 1995, Kleter et al 1998, Sasagawa et al 2000), επιτρέποντας την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος διαφορετικών HPV γονότυπων. Ωστόσο η μεγάλη ποικιλία των αλλοιώσεων που προκαλούν οι HPV καθιστά σημαντική την ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου που θα επιτρέπει την διάγνωση μολύνσεων που έχουν προκληθεί από συγκεκριμένους τύπους HPV υψηλής επικινδυνότητας. Για τον σκοπό αυτό στο εργαστήριο ασχοληθήκαμε με μια μέθοδο η οποία βασίζεται στην διαδικασία της PCR για την τύπο-ειδική ανίχνευση των HPV στελεχών ενισχύοντας το ικό ογκογονιδίο E6. Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε καταρχάς στην δημοσίευση του K.Sotlar και των συνεργατών του και τροποποιήθηκε καταλλήλως ώστε να βελτιστοποιηθούν τα αποτελέσματα της.

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν σε αρχικό επίπεδο εκκινητικά μόρια τα οποία ενισχύουν την περιοχή του γονιδίου E6 ενός μεγάλου φάσματος HPV στελεχών συμπεριλαμβανομένων και των HPV χαμηλής επικινδυνότητας. Στην συνέχεια για τον γονοτυπικό προσδιορισμό των ικών στελεχών των κλινικών δειγμάτων ακολούθησε η μέθοδος της Nested Multiplex PCR. Για την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήσαμε συνολικά 13 ζεύγη τύπο-ειδικών εκκινητικών μορίων, τα οποία είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να μπορούν να ενισχύουν ειδικά για κάθε τύπο HPV το εσωτερικό τμήμα του ήδη ενισχυμένου από την πρώτη PCR ογκογονιδίου E6. Οι τύπο-ειδικοί αυτοί εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν σε μείγματα (cocktails). Εντός των μειγμάτων τα εκκινητικά αυτά μόρια οργανώθηκαν μεταξύ τους έτσι ώστε να έχουν όσο το δυνατόν παραπλήσια την θερμοκρασία υβριδισμού τους. Τέλος ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων της Nested Multiplex PCR σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% και η ταυτοποίηση των ικών στελεχών έγινε βάση του μεγέθους των ενισχυμένων προϊόντων με την βοήθεια του μάρτυρα μοριακού βάρους της Invitrogen .

Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε να βελτιώσουμε σε έναν σημαντικό βαθμό την μέθοδο της Nested Multiplex PCR. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως για την επίτευξη της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 71 κλινικά δείγματα, με την βοήθεια των οποίων εφαρμόσαμε μια σειρά διαφορετικών συνθηκών στην μέθοδο της Nested Multiplex PCR με βασικό στόχο να αυξήσουμε την

ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ιικών HPV στελεχών. Η αύξηση της ευαισθησίας αποτελεί σημαντικό παράγοντα καθώς δίνεται η δυνατότητα να λαμβάνονται ευδιάκριτα σήματα ενίσχυσης ακόμα και όταν το ιικό φορτίο των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα

Στην συνέχεια εξετάστηκαν όλα τα κλινικά δείγματα ξεχωριστά για την ανίχνευση και κατ'επέκταση την ταυτοποίηση των στελεχών HPV υψηλής επικινδυνότητας με την βοήθεια τριών μειγμάτων τύπο-ειδικών εκκινητικών μορίων. Τα τύπο-ειδικά εκκινητικά αυτά μόρια που περιέχονται στα διαφορετικά μείγματα ενισχύουν ειδικά το γονίδιο E6 για κάθε HPV γονότυπο ξεχωριστά. Βάση της ιδιότητας αυτής των εκκινητικών μορίων επιδιώξαμε να ανιχνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε στα κλινικά δείγματα, 14 διαφορετικούς HPV γονότυπους που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου.

Συνολικά από όλη την πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν από τα κλινικά δείγματα αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα.

Μείγμα εκκινητικών μορίων	HPV γονότυποι
Μείγμα -1	HPV-16, 68
Μείγμα -2	HPV-6, 11
Μείγμα -3	HPV-18, 66, 51

Πίνακας 8.1: Αναφορά των στελεχών που ταυτοποιήθηκαν από τα συνολικά 71 κλινικά δείγματα.

Από την διαδικασία ανίχνευσης και ταυτοποίησης των κλινικών δειγμάτων παρατηρούμε ότι από τα 71 συνολικά κλινικά δείγματα, τα 15 έχουν παρουσιάζουν μόλυνση από HPV και βάση της διαδικασίας της Nested Multiplex PCR γνωρίζουμε ακριβώς τον γονότυπο των ιών. Όπως παρατηρούμε από τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα στον πίνακα 7.4 τα δείγματα 665, 739, 793, 796, 825, 868 παρουσιάζουν μόλυνση από δύο διαφορετικά στελέχη HPV ενώ το δείγμα 747 φέρει τριπλή μόλυνση. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε, ότι με την διαδικασία της Nested Multiplex PCR είναι δυνατή η ανίχνευση πολλαπλών μολύνσεων. Η ανίχνευση πολλαπλών μολύνσεων και η ακριβής ταυτοποίηση των στελεχών HPV έχει ερευνητικό και διαγνωστικό ενδιαφέρον καθώς είναι δυνατό οι ερευνητές να προσδιορίσουν σε αρχικό ακόμα στάδιο την ακριβή αλλοίωση (κονδυλώματα-καρκίνος) που μπορεί να προκαλέσει το συγκεκριμένο στέλεχος ή στελέχη HPV.

Επίσης από τον πίνακα των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων παρατηρούμε ότι ένας μεγάλος αριθμός κλινικών δειγμάτων δεν έχει δώσει κανένα σήμα ενίσχυσης με κανένα από τα τρία μείγματα εκκινητικών μορίων. Το γεγονός αυτό ίσως να συμβαίνει διότι τα δείγματα δεν φέρουν ιική μόλυνση. Από την άλλη πλευρά υπάρχει πιθανότητα να μην είναι δυνατή η ανίχνευση των συγκεκριμένων τύπων HPV που υπάρχουν στα αντίστοιχα κλινικά δείγματα βάση των μειγμάτων των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες υπάρχουν συνολικά 19 στελέχη HPV υψηλής επικινδυνότητας και 3 στελέχη ενδιάμεσης επικινδυνότητας τα οποία μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας και κονδυλώματα αντίστοιχα. Στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητικά μόρια τα οποία ενισχύουν και ταυτοποιούν 14 διαφορετικούς τύπους HPV μεταξύ των οποίων τα στελέχη HPV-16 και HPV-18, που εντοπίζονται στο 50% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η διαδικασία της Nested Multiplex PCR που εφαρμόστηκε στο εργαστήριο με τον συγκεκριμένο αριθμό εκκινητικών μορίων ανιχνεύει ένα σημαντικό ποσοστό των ιών που προκαλούν με μεγαλύτερη συχνότητα καρκίνο αλλά δεν έχει την δυνατότητα να εντοπίσει όλους τους τύπους των HPV που προκαλούν ενδοεπιθηλιακές αλλοιώσεις.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η διαδικασία της NMPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαγνωστικούς σκοπούς καθώς έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί τους HPV υψηλής και ενδιάμεσης επικινδυνότητας πριν ακόμα εκδηλωθούν τα κλινικά συμπτώματα. Η μέθοδος αυτή έχει την δυνατότητα να ενισχύει το γένωμα του ιού ακόμα και όταν το ιικό φορτίο είναι σε χαμηλά επίπεδα, καθώς με την διαδικασία της Nested PCR αυξάνεται η ευαισθησία του συστήματος κατά χιλιάδες φορές. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε επιπρόσθετα προβλήματα, όπως η επιμόλυνση του χώρου εργασίας μέσω δημιουργίας “aerosols” και κατά συνέπεια την δημιουργία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά στην συγκεκριμένη εργασία καταφέραμε σε ένα πρώτο επίπεδο να αυξήσουμε την ειδικότητα της μεθόδου της Nested Multiplex PCR και να την εφαρμόσουμε για τον γονοτυπικό προσδιορισμό των HPV υψηλής επικινδυνότητας, που ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκίνου στον τράχηλο της μήτρας. Επόμενο βήμα ερευνητικού ενδιαφέροντος είναι η αύξηση του φάσματος των ιών που μπορεί να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει η διαδικασία της NMPCR που εφαρμόσαμε. Το γεγονός αυτό μπορεί να επιτευχθεί εμπλουτίζοντας τα μείγματα των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν με επιπρόσθετους εκκινητές που ενισχύουν τύπο-ειδικά όλους τους HPV υψηλού και ενδιάμεσου κινδύνου καλύπτοντας με αυτόν τον τρόπο όλο το φάσμα των ιών των ανθρώπινων θηλωμάτων που προκαλούν καρκίνο. Η βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου

και η δυνατότητα της να ανιχνεύει και να προσδιορίζει τον γονότυπο όλων των HPV την καθιστά ένα σπουδαίο εργαλείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες, ιδιαίτερα όταν απαιτείται ο ακριβής προσδιορισμός του HPV γονότυπου καθώς επίσης και η ανίχνευση πολλαπλών μολύνσεων.

9. Βιβλιογραφία

1. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805-809
2. Antonsson A, McMillan NA 2006. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *J Gen Virol.* 87(Pt 11):3195-200
3. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. 2006 . Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer *J Clin Microbiol.*(5):1755-62
4. Artandi SE, Attardi LD 2005. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer *Biochem Biophys Res Commun.*(3):881-90
5. Ashrafi GH, Brown DR, Fife KH, Campo MS 2006. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins *Virus Res.* (1-2):208-11.
6. Baker T.S., Newcomb,W.W., Olson,N.H., Cowser,L.M., Olson,C. and Brown,J.C. (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.*, 60:, 1445–1456.
7. Band V, De Caprio JA, Delmolino L, Kulesa V, Sager R 1991. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol.* 12):6671-6.
8. Barbosa MS, Vass WC, Lowy DR, Schiller JT 1991. In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential *J Virol.* (1):292-8
9. Bechtold V, Beard P, Raj K. 2003. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol.* (3):2021-8

10. Berezutskaya, E., B. Yu, A. Morozov, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 1997. Differential regulation of the pocket domains of the retinoblastoma family proteins by the HPV16 E7 oncoprotein. *Cell Growth Differ.* 8:1277-1286.
11. Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, de Sanjosé S, Moreno V, Puig-Tintore LM, Smith PG, Muñoz N, zur Hausen H. 2001. Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. *J Clin Pathol.* (3):163-75
12. Bosch, FX 1995. Prevalence of HPV in cervical cancer: a worldwide perspective *Journal of the National Cancer Inst;* 87:796-802.
13. Bousarghin L, Touzé A, Sizaret PY, Coursaget P. 2003. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol.* (6):3846-50.
14. Bouvard V, Storey A, Pim D, Banks L 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes *EMBO J.*(22):5451-9.
15. Brehm, A., S. J. Nielsen, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, and T. Kouzarides. 1999. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J.* 18:2449-2458
16. Brooke Bishop, Jhimli Dasgupta, and Xiaojiang Chen 2007. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly *Virol J.* 4: 3.
17. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT 2004 Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors *J Virol.* (2):751-7
18. Charles E. Wood, Zigui Chen, J. Mark Cline, Brigitte E. Miller, and Robert D. Burk 2007. Characterization and experimental transmission of an oncogenic papillomavirus in female macaques. *J Virol.* 81(12):6339-45.
19. Clertant P, Seif I 1984. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature.* 311(5983):276-9.

20. Cole ST, Danos O. 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol.* 4):599-608
21. Conrad, M., V. J. Bubb, and R. Schlegel. 1993. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J. Virol.* 67:6170-6178
22. Corden SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG 1999. The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol Pathol.* (5):275-82
23. Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid III, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman, and L. P. Turek. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 *trans*-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 6:3745-3753
24. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. 2006. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells 1: *J Virol.* (18):8940-50
25. Danos O, Katinka M, Yaniv M 1982. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*;1:231-236
26. Davy CE, Jackson DJ, Wang Q, Raj K, Masterson PJ, Fenner NF, Southern S, Cuthill S, Millar JB, Doorbar J 2002. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol.* (19):9806-18
27. Day PM, Baker CC, Lowy DR, Schiller JT 2004. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (39):14252-7.
28. Day PM, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol.* (1):142-50
29. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and Zur Hauzen H. 2004. Classification of papillomaviruses . *Virology.* 324:17-27

30. Demeret C, M Le Moal, M Yaniv, and F Thierry 1995. Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.*:4777-84
31. Doorbar J 2006 Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer *Clinical Science* 110, (525–541)
32. Dostatni, N., P. F. Lambert, R. Sousa, J. Ham, P. M. Howley, and M. Yaniv. 1991. The functional BPV-1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Dev.* **5**:1657-1671.
33. Dyson N, Guida P, Münger K, Harlow E. 1992. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins *J Virol.* Dec;66(12):6893-902
34. Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937
35. Fang L, Budgeon LR, Doorbar J, Briggs ER, Howett MK. 2006. The human papillomavirus type 11 E1/E4 protein is not essential for viral genome amplification. *Virology.* (2):271-9
36. Fay A, Yutzy WH 4th, Roden RB, Moroianu J. 2004. The positively charged termini of L2 minor capsid protein required for bovine papillomavirus infection function separately in nuclear import and DNA binding. *J Virol.* (24):13447-54
37. Fehrman, F., D. J. Klumpp, and L. A. Laimins. 2003. Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *J. Virol.* **77**:2819-2831
38. Ferlay, J., F. Bray, P. Pisani, and D. M. Parkin. 2001. *GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0.* IARC Press, Lyon, France.
39. Fields, B. N., D. Knipe, and P. M. Howley (ed.). 1996. *Fields virology*, 3rd ed., p. 2060. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa
40. Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol.* (8):4818-26

41. Flores, E., B. L. Allen-Hoffman, D. Lee, and P. F. Lambert. 2000. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J. Virol.* 74:6622-6631
42. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. 2002 .Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* (19):10009-14
43. Fraiser, LD *et al* 1994 "HPV infections in children" *Pediatric Annals*; 23:354-360
44. Francis DA, Schmid SI, Howley PM 2000Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells *J Virol.*(6):2679-86.
45. Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman, and D. A. Galloway. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev.* 11:2090-2100
46. Howley P.M 1996 *Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication*. Raven Press, New York, NY.
47. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJ, Vaccarella S, Franceschi S, Canzian F, Tommasino M 2006. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol.* 44(6):2025-31
48. Gillison, (2001) J. National Cancer inst
49. Grassmann K, Rapp B, Maschek H, Petry KU, Iftner T 1996. Identification of a differentiation-inducible promoter in the E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 (HPV-16) in raft cultures of a new cell line containing high copy numbers of episomal HPV-16 DNA. *J Virol.* 70(4):2339-49
50. Gravitt, P. E., C. L. Peyton, T. Q. Alessi, C. M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D. R. Scott, and R. J. Apple. 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38:357-361
51. Ham J, Steger G, Yaniv M. 1994. Cooperativity in vivo between the E2 transactivator and the TATA box binding protein depends on core promoter structure. *EMBO J.*(1):147-57.

52. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.*(12):3905-10.
53. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler. 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505-512.
54. Heise A. 2003. The clinical significance of HPV Nurse Pract. (10):8-19
55. Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. 2006. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance *J Virol.* (9):4431-9
56. Holt SE, Wilson VG 1995 .Mutational analysis of the 18-base-pair inverted repeat element at the bovine papillomavirus origin of replication: identification of critical sequences for E1 binding and in vivo replication *J Virol.* (10):6525-32
57. Howley P. 1996 Papillomavirinae: The Viruses and Their Replication. Raven Press, New York, NY.
58. Howley, P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication, p. 947-978. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa
59. Huibregtse, J. M., M. Scheffner, and P. M. Howley. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10:4129-4135
60. Jacobs, M. V., A. M. de Roda Husman, A. J. van den Brule, P. J. Snijders, C. J. Meijer, and J. M. Walboomers. 1995. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J. Clin. Microbiol.* 33:901-905
61. Kleter, B., L. J. van Doorn, L. Schrauwen, A. Molijn, S. Sastrowijoto, J. ter Schegget, J. Lindeman, B. ter Harmsel, M. Burger, and W. Quint. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for

- detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J. Clin. Microbiol.* 37:2508-2517
62. Klingelhutz, A. J., S. A. Foster, and J. K. McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380:79-82
 63. Ko, L., and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072
 64. Kremsdorf D, S Jablonska, M Favre, and G Orth 1983. Human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes. *48(2): 340-351*
 65. Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Itoh, M. Yutsudo, H. Ariga, and M. Inoue. 2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28:669-677
 66. Laimins, L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses, p. 201-223. *In* D. J. McCance (ed.), Human tumor viruses. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 67. Lehr E, Hohl D, Huber M, Brown D. 2004. Infection with Human Papillomavirus alters expression of the small proline rich proteins 2 and 3. *J Med Virol.* (3):478-83
 68. Liu, J. P. 1999. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J.* 13:2091-2104.
 69. Liu J.S, Kuo SR, Broker TR, Chow LT 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication. *J Biol Chem.* (45):27283-91
 70. Longworth, M. S., and L. A. Laimins. 2004. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541.
 71. Mahdavi A, Monk BJ. 2005. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer : Promises and Challenges. *The Oncologist*; 10:528-538.

72. Mansky KC, Batiza A, Lambert PF 1997. Bovine papillomavirus type 1 E1 and simian virus 40 large T antigen share regions of sequence similarity required for multiple functions. *J Virol.* 10:7600-8
73. Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA 1998. A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit *J Virol.*72(9):7407-19
74. Munger, K., B. Werness, N. Dyson, W. Phelps, E. Harlow, and P. Howley. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099-4105
75. Muñoz, M.D., F. Xavier Bosch, M.D., Silvia de Sanjosé, M.D., Rolando Herrero, M.D., Xavier Castellsagué, M.D., Keerti V. Shah, Ph.D., Peter J.F. Snijders, Ph.D., Chris J.L.M. Meijer, M.D (2003) Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer *N Engl J Med.*348(6):518-27.
76. Nguyen, M. L., M. M. Nguyen, D. Lee, A. E. Griep, and P. F. Lambert. 2003. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J. Virol.* 77:6957-6964
77. Parkin D.M., Bray,F.I. and Devesa,S.S. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer*, 37:, S4–S66.
78. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. Cancer* 94:153-156.
79. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N 2006. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response *Proc Natl Acad Sci U S A.* (10):3822-7.

80. Peter W. White , Steve Titolo , Karine Brault , Louise Thauvette , Alex Pelletier , Ewald Welchner , Lise Bourgon , Louise Doyon , William W. Ogilvie , Christiane Yoakim , Michael G. Cordingley and Jacques Archambault 2003. Inhibition of Human Papillomavirus DNA Replication by Small Molecule Antagonists of the E1-E2 Protein Interaction. *Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 29, 26765-26772

81. Pfister, H. 2003. Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 31, 52–56.

82. Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P 2004. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria *J Virol.* (13):7199-207

83. Roberto Flores-Mungaia, Erin Siegel, Walter T. Klimecki, and Anna R. Giuliano 2004 Performance Assessment of Eight High-Throughput PCR Assays for Viral Load Quantitation of Oncogenic HPV Types *Journal of Molecular Diagnostics*, Vol. 6, No. 2,

84. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. 1997. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *J Virol.*(5):3554-62.

85. Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.* (10):6432-45

86. Romanczuk H, Thierry F, Howley PM 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters *J Virol.* Jun;64(6):2849-59

87. Sasagawa, T., Y. Minemoto, W. Basha, H. Yamazaki, M. Nakamura, H. Yoshimoto, J. Sakaike, and M. Inoue. 2000. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res.* 67:127-139

88. Schneider-Gadicke, A., and E. Schwarz. 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* **5**:2285-2292.
89. Sedman J, Stenlund A. 1998. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities *J Virol.* (8):6893-7
90. Shafiti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses *J Virol.* (24):13125-35
91. Shih-Yen Chan, H Delius, A L Halpern, and H U Bernard. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol.* 69(5):3074-83
92. Singer, A., L. Ho, G. Terry, and T. S. Kwie. 1995. Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, p. 105-129. *In* A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection*. Edward Arnold, London, United Kingdom.
93. Smotkin D and F O Wettstein 1986 Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(13): 4680–4684.
94. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004 Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 74(1):107-16.
95. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B. 2004 Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 42(7):3176-84
96. Steger, G., and S. Corbach. 1997. Dose-dependent regulation of the early promoter of HPV 18 by the viral E2 protein. *J. Virol.* **71**:50-58.
97. Straight, S. W., P. M. Hinkle, R. J. Jewers, and D. J. McCance. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the

downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J. Virol.* 67:4521-4532.

98. Tan SH, Baker CC, Stünkel W, Bernard HU 2002. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 binding site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology*. 305(2):486-501

99. Tan SH, Gloss B, Bernard HU 1992. During negative regulation of the human papillomavirus-16 E6 promoter, the viral E2 protein can displace Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.*(2):251-6.

100. Titolo S., E. Welchner, P. W. White, and J. Archambault 2003. Characterization of the DNA-Binding Properties of the Origin-Binding Domain of Simian Virus 40 Large T Antigen by Fluorescence Anisotropy *J Virol.* (9): 5512–5518

101. Thorner LK, Lim DA, Botchan MR 1993 . DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *J Virol.* (10):6000-14

102. Ustav M, Stenlund A 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames *EMBO J.*(2):449-57

103. Wang, J., A. Sampath, P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 2001. Both Rb and E7 are regulated by the ubiquitin proteasome pathway in HPV-containing cervical tumor cells. *Oncogene* 20:4740-4749

104. Wazer DE, Liu XL, Chu Q, Gao Q, Band V. 1995. immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(9):3687-91

105. Weimin Qu, Gang Jiang, Yvette Cruz, Chee Jen Chang, Gloria Y. F. Ho, Roberts S. Klein, and Robert D. Burk. PCR Detection of Human Papillomavirus: Comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ Primers Systems.

106. Wilson R, Fehrman F, Laimins LA. 2005. Role of the E1--E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol.* (11):6732-40

107. Y Modis, Trus BL, Harrison SC 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* (18):4754-62

108. Yang, Francisco Martinez Murillo, Hengmi Cui, Richard Blosser, Satoshi Uematsu, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Raphael P. Viscidi, and Richard B. S. Roden 2004 Papillomavirus-like particles stimulate murine bone marrow-derived dendritic cells to produce alpha interferon and Th1 immune responses via MyD88. *J Virol.* Oct;78(20):11152-60.
109. Yoon CS, Kim KD, Park SN, Cheong SW. 2001. alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem Biophys Res Commun.* (3):668-73.
110. Zhi-Ming Zheng and Carl C. Baker 2006. Papillomavirus genome structure expression and post transcriptional regulation *Front Biosci.* 11: 2286–2302
111. Zur Hausen, H (1996). Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.*1288(2):F55-78.
112. Zur Hausen, H (2000) *J. National Cancer inst.*
113. Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2:342-350.

